

**AMANDA ALVES LOZI**

**IMPACTO DAS BEBIDAS LÁCTEAS DE SOJA (TRANSGÊNICA E NÃO  
TRANSGÊNICA) E DO LEITE DE VACA EM TESTÍCULOS E EPIDÍDIMOS DE  
CAMUNDONGOS BALB C**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta

Coorientadoras: Fabiana Cristina S. Alves de Melo  
Janaina da Silva

**VIÇOSA – MINAS GERAIS  
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

L925i  
2023

Lozi, Amanda Alves, 1988-

Impacto das bebidas lácteas de soja (transgênica e não transgênica) e do leite de vaca em testículos e epidídimos de camundongos Balb C / Amanda Alves Lozi. – Viçosa, MG, 2023.

1 tese eletrônica (146 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Geral, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.354>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Espermatogênese em animais. 2. Camundongos - Reprodução. 3. Soja. 4. Isoflavonas. 5. Fitoestrogênios. 6. Testículos - Histologia. I. Matta, Sérgio Luis Pinto da, 1950-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. III. Título.

CDD 22. ed. 599.35

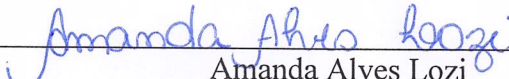
AMANDA ALVES LOZI

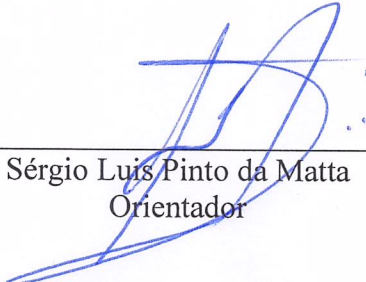
**IMPACTO DAS BEBIDAS LÁCTEAS DE SOJA (TRANSGÊNICA E NÃO  
TRANSGÊNICA) E DO LEITE DE VACA EM TESTÍCULOS E EPIDÍDIMOS DE  
CAMUNDONGOS BALB C**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 29 de maio de 2023.

Assentimento:

  
Amanda Alves Lozi  
Autora

  
Sérgio Luis Pinto da Matta  
Orientador

*A Deus, meus familiares e aos  
meus amigos, que estiveram  
comigo durante toda esta  
caminhada.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me dado proteção e confortado meu coração nos momentos difíceis, me dando muita saúde, força e persistência.

Ao meu marido Daniel, por sempre confiar em mim, por me incentivar, por ser sempre paciente, amoroso, sincero e me proporcionar o melhor da vida. Arthur esta chegando para nos fazer ainda mais felizes.

À minha família, meu pai José Lozi, por todo apoio, por sempre estar ao meu lado, mesmo estando tão distante, minha mãe Eleni, por todas as orações, meus irmãos, Elenice, Rafael e Diego, meus sobrinhos Victor e Lucas, e a Marlúcia, eu amo vocês, não seria quem sou se vocês não fizessem parte da minha vida.

Aos meus amigos do laboratório que serão levados para a vida, Didi, Fran, Tati e João, obrigada pelo apoio em todos os momentos de desespero. Deixo um obrigada mais que especial, pois vocês nunca mediram esforços para me ajudar, principalmente agora, com o Arthur. Didi, você é mais que uma amiga, são 12 anos de amizade e sei que posso contar com você sempre. Gostaria de agradecer também ao Sérgio e Aurélio, orientados do professor Clóvis, que ajudaram em todo período experimental, a ajuda de vocês foi essencial em todo processo.

Aos meus estagiários, Miranda, Letícia, Ingrid, Bruno, Jayne e Izabela, sem a ajuda de vocês tudo teria sido mais difícil.

Aos amigos que a UFV me proporcionou, que são minha fonte de inspiração, Luiz Ladeira, por toda amizade, ideias, apoio e por ter me dado a melhor herança de laboratório. A Jana, por ter me ensinado coisas que levarei pela vida toda, por toda paciência e revisões, sempre com muita boa vontade e cuidado. A Vivi, por sempre me ouvir, me entender e me ajudar a solucionar os problemas mais difíceis. A Talita, pela amizade e por estar sempre presente, me fazendo rir e compartilhando conhecimentos incríveis. A Mariaurea que sempre compartilhou seu conhecimento comigo, sempre disposta a me ajudar, mesmo tendo várias coisas para fazer, por me proporcionar, junto com a professora Reggiane, análises que acrescentaram muito para meu trabalho. A Paty, musa fitness, que me proporcionou muitas risadas e que me ajudou no momento que mais precisei. A Professora Mônica, minha eterna chefinha, que me inspirou e me ensinou o quanto a anatomia é linda. Com você, aprendi o quanto é importante ter conhecimento profundo diverso e atualizado.

Ao meu orientador Sérgio da Matta, por toda dedicação e disponibilidade, pela pessoa e profissional que é, obrigada por todo conhecimento transmitido, por me inspirar, por sempre

ter acreditado e depositado sua confiança em mim. Obrigada por me entender e ser o melhor, ter você como orientador foi um sonho realizado!!

À minha coorientadora Fabiana Melo, obrigada pela disponibilidade e por toda ajuda, aprendi muito com você e espero ainda poder continuar aprendendo. Jamais esquecerei tudo que você fez por mim, os estagiários, a monitoria e os ensinamentos. Entrar na monitoria foi muito importante para mim, eu tinha acabado de ter um aborto e estávamos vivendo uma pandemia, a anatomia me motivou e me fez querer mais e mais. Além disso, meu conhecimento aprofundado de anatomia me fez entender ainda mais a embriologia, histologia e fisiologia.

Aos professores Reggiane e Leandro, que contribuíram grandiosamente para a realização desse trabalho, proporcionando a realização de análises que enriqueceram muito meu trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa – UFV, todos os funcionários, alunos, professores e laboratórios que sempre estiveram à disposição para me ajudar no desenvolvimento das análises.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

LOZI, Amanda Alves, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2023. **Impacto das Bebidas Lácteas de Soja (Transgênica e não Transgênica) e do Leite de Vaca em Testículos e Epidídimos de Camundongos Balb C.** Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta. Coorientadoras: Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo e Janaina da Silva.

Bebidas lácteas de soja, consumidas em grandes quantidades nos dias atuais, possuem alto teor de isoflavonas (30,02 mg/L a 63,6 mg/L). As isoflavonas, são compostos orgânicos naturais, não esteroides, de origem vegetal, presentes principalmente na soja (*Glycine max* (L) Merrill). São denominadas fitoestrógenos, possuindo estrutura química e funcional semelhante à do estrogênio. O consumo de alimentos que possuem isoflavonas está relacionado a prevenção e redução do desenvolvimento do câncer de próstata, sendo uma das vias, a diminuição da testosterona. A testosterona é um hormônio essencial para a espermatogênese e alterações em sua concentração pode gerar danos funcionais, levando à infertilidade. Atualmente, dados fragmentados sobre os efeitos do consumo de alimentos que possuem isoflavonas, como as bebidas lácteas de soja, nos testículos e epidídimos, dificultam definir uma dose segura de ingestão diária para a espermatogênese. O objetivo deste trabalho foi avaliar sistematicamente, dados na literatura que mostrem os efeitos das isoflavonas da soja nos testículos de modelos murinos. Além disso, avaliar o impacto das bebidas lácteas de soja (transgênica e não transgênica) e do leite de vaca em testículos e epidídimos de camundongos Balb C adultos, durante 42 dias, nos testículos e epidídimos. A revisão sistemática foi realizada de acordo com as diretrizes do PRISMA, utilizando uma busca estruturada em três bases de dados, recuperando e analisando 22 estudos originais. As isoflavonas mais utilizadas nos trabalhos avaliados foram a genisteína/daidzeína conjugadas e seu consumo altera negativamente a função das células de Leydig, podendo levar à infertilidade em modelos murinos. No estudo experimental, após o período de tratamento, os animais foram anestesiados e pesados. Os testículos e epidídimos foram removidos, dissecados e pesados, para análises posteriores. Fragmentos testiculares e epididimários foram processados para microscopia de luz. Os resultados foram comparados pelo teste Student Newman-Keuls ( $p < 0.05$ ). O tratamento com bebidas lácteas de soja resultou em diminuição do peso corporal. Os níveis séricos de testosterona permaneceram inalterados durante um ciclo espermatogênico. Entretanto, nos testículos, o tratamento as bebidas lácteas de soja causaram alterações morfológicas nas células de Leydig, não excluindo seu efeito na produção de testosterona após um período maior de tratamento. O Leite de vaca causou aumento do diâmetro e área de túbulo e diminuição do diâmetro e área de lume. No epidídimo,

o tratamento com as bebidas lácteas de soja resultou no surgimento de vacuolização no epitélio e redução dos túbulos normais nas regiões do segmento inicial e corpo. Concluímos que altas doses de isoflavonas alteram negativamente o funcionamento das células de Leydig, induzindo alterações testiculares, levando à infertilidade em modelos murinos. No estudo experimental, as bebidas lácteas de soja por um ciclo do epitélio seminíferos causa alterações morfológicas nas células de Leydig, além de alterações na histologia epididimária. O leite de vaca pode afetar a espermatogênese, uma vez que diminuiu o epitélio. Alterações na estrutura ou função do testículo e epidídimo pode gerar graves consequências para a reprodução. Nosso estudo pode contribuir para a utilização das bebidas lácteas de soja e leite de vaca serem consumidos garantido a saúde reprodutiva masculina.

Palavras-chave: Soja. Isoflavonas. Fitoestrógenos. Reprodução. Machos.

## ABSTRACT

LOZI, Amanda Alves, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2023. **Impact of Soy Milk Drinks (Transgenic and Non-Transgenic and) and Cow's Milk on Testes and Epididymis of Balb C Mice.** Adviser: Sérgio Luis Pinto da Matta. Co-Advisers: Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo and Janaina da Silva.

Soy milk drinks, consumed in large quantities nowadays, have a high content of isoflavones (30.02 mg/L to 63.6 mg/L). Isoflavones are natural, non-steroidal organic compounds of vegetable origin, mainly present in soybeans (*Glycine max* (L) Merrill). They are called phytoestrogens, having a chemical and functional structure similar to that of estrogen. The consumption of foods that have isoflavones is related to the prevention and reduction of the development of prostate cancer, one of the ways being the decrease of testosterone. Testosterone is an essential hormone for spermatogenesis and changes in its concentration can cause functional damage, leading to infertility. Currently, fragmented data on the effects of consuming foods that contain isoflavones, such as soy milk drinks, on the testes and epididymis, make it difficult to define a safe daily intake dose for spermatogenesis. The objective of this work was to systematically evaluate data in the literature that show the effects of soy isoflavones on the testes of murine models. Furthermore, to evaluate the impact of soy milk drinks (transgenic and non-transgenic) and cow's milk on the testes and epididymis of adult Balb C mice, during 42 days, on the testes and epididymis. The systematic review was performed according to PRISMA guidelines, using a structured search in three databases, retrieving and analyzing 22 original studies. The most used isoflavones in the studies evaluated were conjugated genistein/daidzein and their consumption negatively alters the function of Leydig cells, which may lead to infertility in murine models. In the experimental study, after the treatment period, the animals were anesthetized and weighed. Testicles and epididymis were removed, dissected, and weighed for further analysis. Testicular and epididymal fragments were processed for light microscopy. Results were compared using the Student Newman-Keuls test ( $p < 0.05$ ). Treatment with soy milk drinks resulted in a decrease in body weight. Serum testosterone levels remained unchanged during a spermatogenic cycle. However, in the testes, treatment with soy milk drinks caused morphological changes in Leydig cells, not excluding its effect on testosterone production after a longer period of treatment. Cow's milk caused an increase in the diameter and area of the tubule and a decrease in the diameter and area of the lumen. In the epididymis, treatment with soy milk drinks resulted in the appearance of

vacuolization in the epithelium and reduction of normal tubules in the initial segment and body regions. We conclude that high doses of isoflavones negatively alter the functioning of Leydig cells, inducing testicular alterations, and leading to infertility in murine models. In the experimental study, soy milk drinks by a cycle of the seminiferous epithelium caused morphological changes in Leydig cells, in addition to changes in epididymal histology. Cow's milk may affect spermatogenesis, as it thinned the epithelium. Changes in the structure or function of the testis and epididymis can have serious consequences for reproduction. Our study may contribute to the use of soy and cow's milk drinks to be consumed to ensure male reproductive health.

Keywords: Soy. Isoflavones. Phytoestrogens. Reproduction. Male.

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO GERAL .....                          | 14 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA .....                     | 15 |
| 2.1 Soja.....                                      | 15 |
| 2.2 Fitoestrógenos .....                           | 17 |
| 2.3 Estrogênio .....                               | 18 |
| 2.4 Leite de Vaca.....                             | 19 |
| 2.5 Sistema reprodutor masculino: testículo .....  | 20 |
| 2.6 Sistema reprodutor masculino: epidídimo.....   | 22 |
| 2.7 Estresse oxidativo.....                        | 22 |
| 3. OBJETIVOS .....                                 | 24 |
| 3.1 Objetivos gerais.....                          | 24 |
| 3.2 Objetivos específicos.....                     | 24 |
| 3.2.1 Revisão sistemática .....                    | 24 |
| 3.2.2 Testículo:.....                              | 25 |
| 3.2.3 Epidídimo:.....                              | 25 |
| 3.2.4 Bebida láctea de soja e leite de vaca: ..... | 26 |
| 3.2.5 Sorologia .....                              | 26 |
| 4. REFERÊNCIAS .....                               | 27 |
| CAPÍTULO 1 .....                                   | 35 |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                | 37 |
| 2. MATERIAL E METODOS .....                        | 38 |
| 2.1 Perguntas Norteadoras.....                     | 38 |
| 2.2 Estratégia de Busca .....                      | 38 |
| 2.3 Critérios de seleção .....                     | 39 |
| 2.4 Extração de dados.....                         | 40 |
| 2.5 Análise de Viés .....                          | 40 |
| 3. RESULTADOS.....                                 | 41 |

|  |    |
|--|----|
| 3.1 Seleção de estudos guiado pelo PRISMA .....  | 41 |
| 3.2 Características das Publicações e Animais Experimentais.....   | 43 |
| 3.3 Características do Desenho Experimental.....   | 43 |
| 3.4 Características das Isoflavonas.....   | 49 |
| 3.5 Principais resultados.....   | 51 |
| 3.5.1 Processos Biológicos.....  | 54 |
| 3.5.2. Relação entre classes e doses de isoflavonas .....  | 58 |
| 3.6 Risco do viés .....  | 60 |
| 4. DISCUSSÕES.....   | 62 |
| 5. CONCLUSÕES.....   | 67 |
| 6. REFERÊNCIAS .....   | 69 |
| CAPÍTULO 2.....  | 82 |
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 84 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS .....  | 86 |
| 2.1 Animais .....  | 86 |
| 2.2 Tratamento .....   | 86 |
| 2.3 Coleta de amostras, biometria corporal e testicular .....  | 89 |
| 2.4 Processamento do material histológico para microscopia de luz .....  | 89 |
| 2.5 Histomorfometria testicular.....   | 90 |
| 2.5.1 Diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero, diâmetro do lume, áreas de elementos tubulares e relação túbulo/epitélio..... | 90 |
| 2.5.2 Comprimento total dos túbulos seminíferos e comprimento total de túbulo por grama de testículo .....                           | 90 |
| 2.5.3 Volumetria dos componentes testiculares e índices tubulossomático, epiteliossomático e Leydigossomático.....                   | 91 |
| 2.5.4 Contagem da população celular de túbulos no estágio I do ciclo do epitélio seminífero.....                                     | 92 |
| 2.5.5 Razões entre os números celulares.....   | 92 |
| 2.5.6 Número de células de Sertoli por testículo e por grama de testículo .....  | 93 |
| 2.5.7 Produção espermática diária por testículo e por grama de testículo.....  | 93 |

|   |     |
|---|-----|
| 2.5.8 Diâmetro nuclear, volumes nuclear, citoplasmático e de uma célula de Leydig e número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo..... | 93  |
| 2.6 Determinação da concentração de testosterona.....   | 94  |
| 2.7 Histopatologia testicular.....  | 94  |
| 2.8 Análise antioxidante (Sequestro por DPPH).....  | 95  |
| 2.9 Avaliação do estado oxidativo .....   | 95  |
| 2.9.1 Quantificação das enzimas antioxidantes.....  | 96  |
| 2.9.2 Determinação do subproduto da peroxidação lipídica – Malondialdeído (MDA) .....   | 96  |
| 2.9.3 Oxido nítrico (NO).....   | 97  |
| 2.10 Análises estatísticas.....   | 97  |
| 3. RESULTADOS.....  | 97  |
| 3.1 Biometria corporal e testicular .....   | 97  |
| 3.2 Histomorfometria tubular.....   | 98  |
| 3.3 Contagem de células do estágio I.....   | 101 |
| 3.4 Histomorfometria intertubular.....  | 102 |
| 3.5 Testosterona .....  | 105 |
| 3.6 Histopatologia testicular.....  | 106 |
| 3.7 Análise antioxidante (Sequestro por DPPH).....  | 107 |
| 3.8 Análise do estado oxidativo .....   | 107 |
| 4. DISCUSSÃO.....   | 109 |
| 5. CONCLUSÕES.....  | 115 |
| 6. REFERÊNCIAS .....  | 116 |
| CAPÍTULO 3 .....  | 123 |
| 1. INTRODUÇÃO .....   | 125 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS .....   | 127 |
| 2.1 Animais .....   | 127 |
| 2.2 Tratamento .....  | 127 |
| 2.3 Coleta de amostras, biometria corporal e do epidídimo .....   | 130 |
| 2.4 Processamento do material histológico para microscopia de luz .....   | 130 |

|  |     |
|--|-----|
| 2.5 Avaliação histomorfométrica do epidídimo ..... | 130 |
| 2.6 Avaliação histopatológica .....                | 131 |
| 2.7 Análise antioxidante (Sequestro por DPPH)..... | 131 |
| 2.8 Análises estatísticas.....                     | 132 |
| 3. RESULTADOS.....                                 | 132 |
| 3.1 Biometria corporal e epididimal.....           | 132 |
| 3.2 Histomorfometria epididimal .....              | 133 |
| 3.3 Avaliação histopatológica epididimal .....     | 135 |
| 3.4 Análise antioxidante (Sequestro por DPPH)..... | 136 |
| 4. DISCUSSÃO.....                                  | 136 |
| 5. CONCLUSÕES.....                                 | 139 |
| 6. REFERÊNCIAS .....                               | 140 |
| CONCLUSÕES GERAIS .....                            | 145 |

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

As isoflavonas (genisteína, daidzeína, formononetina, biocanina A e equol) consumidas em grandes quantidades, são compostos orgânicos naturais, não esteroides, de origem vegetal, presentes principalmente na família Fabaceae (Strauss et al., 1998). São denominados fitoestrógenos, possuindo estrutura química e funcional semelhante à do estradiol. Quando absorvidas pelos seres vivos conseguem se ligar a receptores específicos de estrógenos endógenos (Navarro, 2005).

Em fêmeas, as isoflavonas geram benefícios pela atuação semelhante aos hormônios femininos (Bu et al., 2005, Medigović et al., 2015), e também em machos, no tratamento e prevenção do câncer de próstata (Strom et al., 1999; McCormick et al., 2007; Zhou et al., 2007). Porém, em machos, alguns dos efeitos positivos ocasionados pelo consumo de isoflavonas ocorre devido à diminuição da testosterona sérica, hormônio essencial para a espermatogênese, essa redução também pode gerar danos testiculares, levando à infertilidade (Srilatha e Adaikan, 2003). Os efeitos terapêuticos atribuídos às isoflavonas induziram o aumento mundial do seu consumo (Branca e Lorenzetti, 2005). A disponibilidade de isoflavonas em cada tipo ou até mesmo dentro de um mesmo grupo de alimento sofre variações, dificultando assim o controle de consumo diário (Retana-Márquez et al., 2012). As leguminosas, como a soja, cereais integrais e algumas sementes presentes na dieta, possuem índices elevados de isoflavonas, podendo variar de 30,02 mg/L a 63,6 mg/L (Setchell e Cole, 2003; Retana-Márquez et al., 2012).

Os testículos são responsáveis pela contínua produção de espermatozoides e de testosterona, sendo que qualquer desequilíbrio na função testicular pode levar à infertilidade (Russell e Griswold, 1993; Branca e Lorenzetti, 2005). Os epidídimos recebem os espermatozoides dos testículos através dos ductulos eferentes para adquirirem motilidade e capacidade fecundante (Shum *et al.*, 2009). Há estudos indicando que diversos compostos, como as isoflavonas conjugadas encontradas na soja, ou isoladas, como a genisteína, podem atuar como desreguladores endócrinos, levando a uma disfunção testicular e epididimária (Setchell *et al.*, 2002; Branca e Lorenzetti, 2005, Navarro, 2005; Yildiz, 2005; Cederroth *et al.*, 2010; Akingbemi *et al.*, 2015). Quando absorvidas, as isoflavonas podem se ligar a receptores de estrogênio (ER $\alpha$  e ER $\beta$ ) e desencadear ações semelhantes ao estrogênio nos tecidos-alvo (Farmakalidis et al., 1985, Navarro, 2005; Yildiz, 2005). Embora o efeito estrogênico desses fitoestrógenos seja muito fraco (Setchell et al., 1997), eles podem exercer efeito agonístico e/ou

antagonístico sobre os receptores (ER $\beta$ ) endógenos, devido a competição (Folman e Pope, 1966).

Existem alguns mecanismos possíveis para a atividade das isoflavonas, como a ação inibitória direta sobre os testículos, ou a alteração do eixo hipotálamo-hipófise, que promovem mudanças nas concentrações plasmáticas do hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) (Branca e Lorenzetti, 2005). A redução do LH pode prejudicar a função das células de Leydig, levando à diminuição da produção de T (Branca e Lorenzetti, 2005). Por outro lado, a redução do FSH pode prejudicar as células de Sertoli, perturbando a espermatogênese (Branca e Lorenzetti, 2005). Alterações morfofisiológicas nas gônadas masculinas, induzidas pela absorção de isoflavonas, pode afetar negativamente a realização de processos essenciais para a formação de gametas masculinos viáveis (Kreiger et al., 1982; Chavarro et al., 2008).

As isoflavonas têm vários efeitos na função sexual (Najaf e Ghazanfarpour, 2018). A genisteína, principal isoflavona da soja, pode causar efeitos positivos para a saúde reprodutiva feminina, como regulação hormonal, prevenção e tratamento do câncer de mama (Cotroneo et al., 2001; Bu et al., 2005). Entretanto, seus efeitos são pouco conhecidos no sistema reprodutor masculino (Setchell, 1998; Jefferson et al., 2005).

Vale salientar que não existem trabalhos que avaliem a histomorfometria e estado oxidativo testicular após ingestão de alimentos que possuem altos índices de isoflavonas, como a bebida láctea de soja. Trabalhos avaliando os parâmetros masculinos com o leite de vaca, também são escassos. Desta maneira, este trabalho objetivou-se avaliar o impacto da ingestão diária das bebidas lácteas de soja (transgênica e não transgênica) e o leite de vaca, nos testículos e epidídimos de camundongos Balb C adultos. A realização de pesquisas relacionadas à histomorfometria testicular é de extrema importância, a fim de se verificar a eficácia e segurança do consumo diário de bebidas lácteas de soja e leite de vaca para a saúde reprodutiva masculina.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Soja**

A soja está entre os alimentos mais funcionais e altamente consumidos mundialmente e, embora tenha sido mencionada somente em 1941 nas estatísticas oficiais de produção de grãos do Rio Grande do Sul, a primeira referência sobre seu cultivo no Brasil foi em 1882 (Verneti, 1977). Sua composição química, com base em 100 g de amostra seca, constitui-se de

40 g de proteínas, 30 g de glicídios, 20 g de lipídios, 226 mg de cálcio, 546 mg de fósforo e 8,8 mg de ferro (Wolf e Cowan, 1971; Sgarbieri *et al.*, 1981). Além da proteína, a soja fornece ácidos graxos e linolênico (Nawar, 1985) e algumas vitaminas, como a B6 (piridoxina) e B12 (cianocobalamina) (Franco, 1986).

O grão intacto de soja pode conter, além de carboidratos, ácidos graxos (83% de ácidos graxos insaturados), proteínas e minerais, 4% de saponinas, 5% de lecitinas,  $\beta$ -sitosteróis,  $\alpha$ -tocoferóis e inibidores de protease, embora as isoflavonas despertem maior interesse devido às suas propriedades biológicas (Nawar, 1985; Franco, 1986). A utilização da soja tem como foco principal a alimentação humana e animal, sendo consumida em diversas formas como a bebida láctea de soja e em forma de grãos (Sediyama *et al.*, 2015). A bebida láctea de soja é conhecida por ser uma excelente fonte proteica, sendo uma alternativa para veganos ou pessoas que possuem intolerância à lactose (Mollakhalili *et al.*, 2022). Assim como nos grãos, encontramos também na bebida láctea de soja as isoflavonas (Kuiper *et al.*, 1997; Kuiper *et al.*, 1998). As isoflavonas são compostos pertencentes ao grupo dos flavonoides, que se caracterizam por apresentar estrutura polifenólica (Nawar, 1985; Franco, 1986).

O total de isoflavonas encontradas na soja distribui-se, basicamente, em isoflavonas agliconas e glicosiladas, que se diferem pela ligação a glicose (Ahluwalia *et al.*, 1953). Por outro lado, Eldridge (1982) e Fukutake *et al.* (1996) afirmaram que genisteína é a principal isoflavona e constitui de 50 a 90% dos flavonoides da farinha de soja. Um conjunto crescente de evidências mostram que o consumo de soja pós diagnóstico de câncer, de mama ou de próstata, confere proteção contra a evolução do câncer (Kennedy, 1995; Messina, 2016; Applegate *et al.*, 2018; Boutas *et al.*, 2022). Dados epidemiológicos relacionam a diminuição do risco de câncer de mama, próstata e cólon após o consumo da soja, onde alguns de seus componentes possuem atividades consistentes com a eficácia na quimioprevenção, como inibidores de protease (Troll e Wiesner, 1983; Kennedy, 1995; Aldercreutz, 2002; Boutas *et al.*, 2022), além da variedade de isoflavonas que são biologicamente ativas. Baseada na atividade das isoflavonas da soja como inibidores da carcinogênese, estudos indicam que misturas de isoflavonas podem ser utilizadas na quimioprevenção do câncer humano (Troll e Wiesner, 1983, Kennedy, 1995).

Embora existam muitos estudos que indiquem os benefícios do consumo de soja na redução do desenvolvimento do câncer (Troll e Wiesner, 1983; Kennedy, 1995; Aldercreutz, 2002; Messina, 2016; Applegate *et al.*, 2018; Boutas *et al.*, 2022), seus efeitos no sistema reprodutor masculino ainda não são completamente esclarecidos (Faqi *et al.*, 2004). Há

evidências de que o consumo de soja e seus derivados pode causar danos no equilíbrio androgênico testicular (Guan *et al.*, 2008; Sherrill *et al.*, 2010; Akingbemi *et al.*, 2015), o que pode ocasionar a diminuição da produção e qualidade espermática, induzindo a redução da fertilidade (Carlsen *et al.*, 1992).

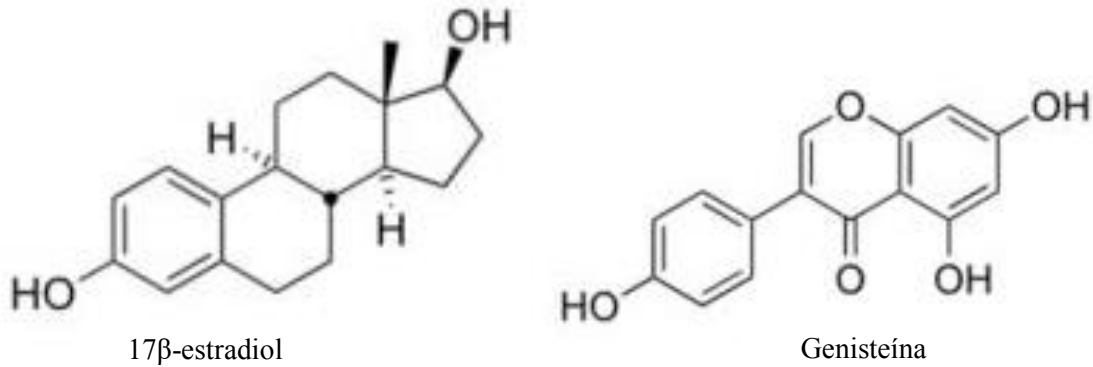
## 2.2 Fitoestrógenos

Os fitoestrógenos são compostos não esteroides derivados das plantas, sendo divididos em quatro grupos principais: isoflavonas (genisteína, daidzeína, glicetina, formononetina, biochanina A e equol, um metabólito de isoflavonas), flavonas (quercetina e camferol), coumestans (cumestrol) e lignanas (enterolactona e enterodiol) (Thompson *et al.*, 1996; Strauss *et al.*, 1998). Os fitoestrógenos possuem estrutura semelhante à dos estrogênios (Figura 1) produzidos pelos animais e, quando absorvidos, essa característica possibilita sua ligação a receptores endógenos específicos (Receptores de estrogênio - ER $\alpha$  e ER $\beta$ ) (Navarro, 2005). O conteúdo de fitoestrógeno sofre variações em cada tipo de alimento, podendo ainda variar significativamente dentro do mesmo grupo (bebidas de soja, tofu), dependendo dos mecanismos de processamento (Retana-Márquez *et al.*, 2012). Leguminosas (em particular a soja), cereais integrais e algumas sementes, presentes na alimentação diária, são ricos em fitoestrógenos (Retana-Márquez *et al.*, 2012).

Após a absorção, os fitoestrógenos podem atuar da mesma forma que os estrógenos, mas seus efeitos não são necessariamente idênticos, podendo causar alterações biológicas devido a sua atuação como desregulador endócrino (Eldridge, 1982; Fukutake *et al.*, 1996; Navarro, 2005; Yildiz, 2005) por competirem com esteróides endógenos. Portanto, o equilíbrio entre a atividade estrogênica e antiestrogênica é determinado pela razão fitoestrógeno-estrogênio (Folman e Pope, 1966). Sabe-se que o aumento da exposição a estrogênio ou a fitoestrógenos perturba o ambiente hormonal durante o desenvolvimento embrionário e pode estar associado ao aumento da incidência de anomalias reprodutivas masculinas em animais experimentais (Bay *et al.*, 2006).

A ação e a concentração dos fitoestrógenos após ingestão podem sofrer variações dependendo da idade, sexo ou estágio de desenvolvimento de um indivíduo, sendo muito mais elevada em lactentes alimentados com fórmulas à base de soja, podendo atingir entre 1,53 e 2,50  $\mu$ M (Setchell *et al.*, 1997, 1998). Além disso, os níveis séricos de genisteína no adulto podem atingir 10  $\mu$ M a curto prazo, após o consumo de uma dieta rica em fitoestrógeno (Busby *et al.*, 2002). Níveis elevados de exposição são preocupantes, pois as isoflavonas da soja são

conhecidas por exibir propriedades estrogênicas potentes *in vivo* e *in vitro* e, se consumidas por longos períodos e/ou em níveis elevados, esses agentes podem exercer toxicidade reprodutiva (Gutendorf e Westendorf, 2001; Diel *et al.*, 2002). De fato, vários estudos demonstraram que o consumo de dietas à base de genisteína modula os níveis séricos de andrógenos em espécies laboratoriais (Sharpe *et al.*, 2002; Wisniewski *et al.*, 2003; Tan *et al.*, 2006).



**Figura 1** – Estrutura química do 17β-estradiol (fórmula fisiológica do estrogênio) e da genisteína (um tipo de isoflavonas. Fonte: Prossnitz e Barton, 2011).

### 2.3 Estrogênio

O estrogênio, hormônios produzidos naturalmente pelo organismo, encontrados em maiores concentrações em fêmeas, têm como função principal, estimular o aparecimento das características secundárias femininas e a ovogênese (Schairer *et al.*, 2000). Em machos, o estrogênio é encontrado em menores concentrações, sendo a testosterona o principal hormônio responsável pelo surgimento das características secundárias masculinas e pela manutenção da espermatogênese (Russell e Griswold, 1993). A secreção dos hormônios gonadais é regulada pelo eixo hipotálamo-adeno-hipófise (Russell e Griswold, 1993). Em resposta ao hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) do hipotálamo, a hipófise anterior secreta os hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) que, em machos, vão atuar diretamente nas células de Sertoli e nas células de Leydig, respectivamente (Russell e Griswold, 1993).

No sistema reprodutor masculino, o estrogênio pode ser produzido por pelo menos duas vias diferentes (gordura e pele), sendo encontrado em diversas concentrações no sêmen de várias espécies (Hess *et al.*, 2001A; Hess *et al.*, 2001B). Em machos, os níveis normais de estrogênio mantêm o equilíbrio do organismo, mas o excesso pode inibir a síntese de testosterona (Dadoune e Demoulin, 1993). Níveis elevados de estrogênio podem causar redução na produção de LH, interferindo negativamente na função das células de Leydig, diminuindo a produção de T e do FSH (interferindo diretamente nas células de Sertoli), além de prejudicar a

espermatogênese (Branca e Lorenzetti, 2005). Outros efeitos dos estrogênios são diminuição na captação de cálcio e redução da calcificação, indução de efeito anabólico proteico estando relacionado a ganho de peso e eficiência alimentar (Kaltenbach e Dunn, 1982).

## 2.4 Leite de Vaca

O leite de vaca, altamente consumido por seres humanos, é uma fonte de nutrientes essenciais como cálcio e proteínas (Liu *et al.*, 2021; Yenew *et al.*, 2022), fornecendo suporte para várias funções do organismo (Renhe 2008). O leite integral cru contém 29,36% de gordura, 26,98% de proteína (22,22% de caseína e 4,76% de proteínas de soro) e 38,1% de lactose (Kailasapathy, 2008; Pereira *et al.*, 2017). Por ser uma fonte rica em nutrientes, crianças que não consomem leite de vaca apresentam falta de energia e diminuição nas taxas de cálcio, proteínas e lipídios (Medeiros *et al.*, 2004).

Segundo Pereira *et al.* (2017), o sabor agradável e levemente adocicado, característico do leite de vaca, é devido a presença de grandes quantidades de lactose em sua composição. De acordo com o modo de produção, constituição, requisitos físico-químicos e biológicos do leite de vaca, podemos classificá-lo em A, B ou C, a partir da contagem de microrganismos presentes em sua composição (Venturine *et al.*, 2007).

O leite de vaca possui em sua constituição grande quantidade de estrogênio, progesterona, que exercem papel fundamental nos sistemas reprodutor, neuroendócrino, esquelético e imunológico (Ganmaa *et al.*, 2001; Hamilton *et al.*, 2014). Na composição do leite de vaca, pode ser encontrado também, isoflavonas, sendo a genisteína o fitoestrógeno mais proeminente, medido em concentrações de 58,9 a 89,8 µg/kg (Flachowsky *et al.*, 2011). Traços de equol, enterolactona, formononetina e daidzeína também são detectados no leite, principalmente, após a suplementação das vacas com farelo de soja em alta dosagem (Flachowsky *et al.*, 2011). Segundo Lazari *et al.*, (2009). Níveis normais de estrogênio em homens mantêm o equilíbrio do sistema reprodutor masculino, como absorção concentração espermática durante a passagem nos ductulos eferentes, já o excesso pode inibir a síntese de testosterona (Dadoune e Demoulin, 1993). O estrogênio ou as isoflavonas no sistema reprodutor masculino, pode causar alterações por vias fisiológicas no desenvolvimento, na multiplicação das células de Sertoli e no controle da função das células de Leydig (Hess *et al.*, 2001B).

## 2.5 Sistema reprodutor masculino: testículo

O sistema reprodutor masculino é composto por vários órgãos (testículos, ductulo eferentes, epidídimos, ductos deferentes, glândulas anexas e o pênis) responsáveis por sintetizar a testosterona e produzir, nutrir, maturar, armazenar e transportar os espermatozoides (Figura 2) (Russell e Griswold, 1993). Os testículos, localizados no escroto, possuem funções endócrinas e exócrinas, e são envolvidos por uma cápsula espessa (túnica) de tecido conjuntivo denso, a albugínea testicular (Russell *et al.*, 1990). A túnica albugínea emite septos para o interior do testículo até o mediastino, dividindo o órgão em lóbulos (Russell *et al.*, 1990). Em mamíferos, os testículos são divididos funcionalmente em dois compartimentos, o intertubular e o tubular, que formam o parênquima testicular (Russell *et al.*, 1990).

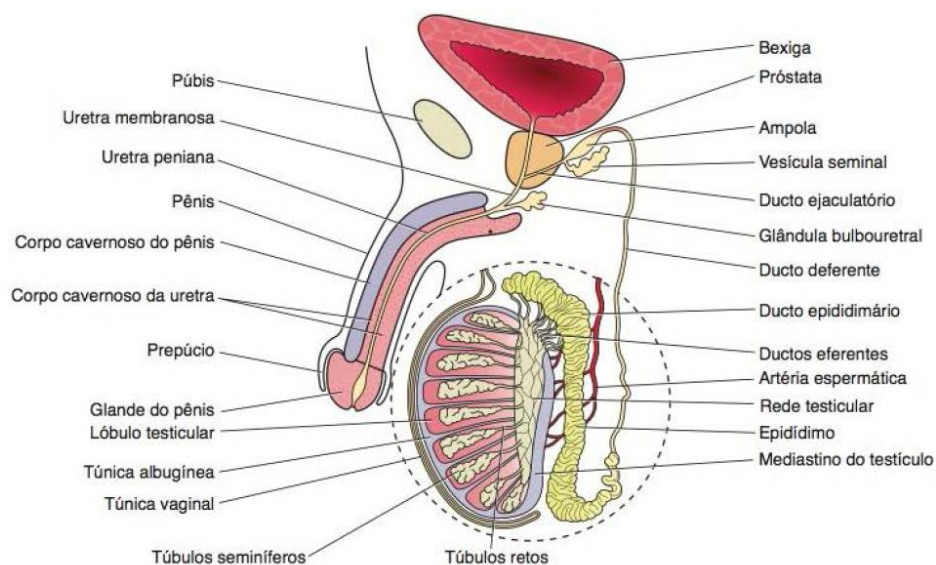
Células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e uma população celular variável constituída principalmente por fibroblastos, macrófagos, telócitos e, eventualmente, mastócitos, fazem parte do compartimento intertubular (Russell *et al.*, 1990; Setchell, 1991; Liu *et al.*, 2019). A produção de testosterona, hormônio essencial para o funcionamento da espermatogênese e expressão das características sexuais secundárias masculinas, ocorre no compartimento intertubular, sendo realizada pelas células mais abundantes da região, as células de Leydig (Russell e Griswold, 1993).

Na maioria dos mamíferos estudados, o compartimento tubular, constituído pelos túbulos seminíferos, corresponde de 70 a 90% do parênquima (França e Russell, 1998). Os túbulos seminíferos são formados pela túnica própria, epitélio seminífero e lume (Russell *et al.*, 1990). A túnica própria é composta pelas células mioídes, fibras colágenas e membrana basal, que envolve o túbulo externamente, apresentando como função movimentar fluido e promover a propulsão dos espermatozoides através do lume (Russell *et al.*, 1990). O epitélio seminífero é formado pelas células de Sertoli e pelas células germinativas (Russell *et al.*, 1990; Skinner e Griswold, 2005). As células de Sertoli possuem diversas funções, como manter o epitélio seminífero íntegro, secretar fluidos e proteínas, participar do processo de espermição, realizar fagocitose, permitir a movimentação de células no epitélio e regular o ciclo espermatogênico através de suas junções com as demais células (Skinner e Griswold, 2005). Além das diversas funções citadas, as células de Sertoli formam junções de oclusão que dividem o compartimento tubular em ambiente basal e o adluminal, isolando as células haploides, o que evita contato com o sistema imune do animal, formando a barreira de célula de Sertoli (Morais *et al.*, 2016).

A espermatogênese, que ocorre nos túbulos seminíferos, é um processo complexo e organizado, responsável pela produção de espermatozoides, tendo duração de 40 a 60 dias na

maioria dos mamíferos, sendo que em camundongos é de 42 dias (França e Russell, 1998). O processo de produção espermática pode ser dividido de acordo com suas funções em três fases: 1 – fase proliferativa, 2 – fase meiótica e 3 – fase de diferenciação (Russell *et al.*, 1990). Na fase proliferativa as células germinativas sofrem sucessivas divisões mitóticas, na fase meiótica o material genético é recombinado, segregado e cada espermatócito primário dá origem a quatro espermátides arredondadas (Russell *et al.*, 1990). Por fim, após o processo de divisão celular, inicia-se a fase de diferenciação ou espermiogênese, em que as espermátides arredondadas passam por modificações, formando as espermátides alongadas, dando origem aos espermatozoides (Russell *et al.*, 1990).

Para que a espermatogênese ocorra, as células germinativas interagem continuamente com os componentes somáticos do testículo, principalmente com as células de Sertoli e as células de Leydig (Skinner, 1991; França e Russell, 1998). As células de Leydig produzem a testosterona que é utilizada em altas concentrações na espermatogênese, principalmente no processo de meiose (Skinner, 1991; França e Russell, 1998; França *et al.*, 2016). A interação hormonal das células germinativas acontece via células de Sertoli, já que elas não expressam receptores para andrógenos (Skinner, 1991; França e Russell, 1998). O processo espermatogênico só será eficiente e bem-sucedido caso a interação hormonal aconteça da forma contínua e adequada (Skinner, 1991; França e Russell, 1998; Skinner e Griswold, 2005; França *et al.*, 2016). Qualquer alteração morfofisiológica nas gônadas pode afetar negativamente a realização de processos essenciais para a formação de espermatozoides viáveis (Kreiger *et al.*, 1982; Chavarro *et al.*, 2008).



**Figura 2** – Órgãos que formam o sistema reprodutor masculino. Fonte: Junqueira e Carneiro, 2013.

## 2.6 Sistema reprodutor masculino: epidídimo

Os epidídimos recebem os espermatozoides dos testículos através dos ductulos eferentes para adquirirem motilidade e capacidade fecundante (Shum *et al.*, 2009). O epitélio epididimário é pseudoestratificado prismático com estereocílios, composto por uma população variada de células que incluem as células principais, basais, apicais, halo, claras e estreitas (Herms e Robaire, 2002; Oliva *et al.*, 2009).

Cada epidídimo é formado por um longo e único ducto enovelado e contorcido (Sullivan, 2004), sendo o epidídimo de murinos dividido anatomicamente em quatro regiões principais: segmento inicial, cabeça, corpo e cauda (Herms e Robaire, 2002; Cornwall, 2009). Estas regiões são definidas pelo estudo da altura do epitélio, do diâmetro tubular e da variação na frequência celular que compõem o epitélio (Herms e Robaire, 2002; Cornwall, 2009). Cada região epididimária apresenta funções específicas. No segmento inicial ocorre a absorção de fluidos vindos do testículo, na cabeça e no corpo processos iniciais e tardios de maturação espermática, e na cauda armazenamento espermático e a fagocitose de espermatozoides anormais (Robaire e Viger, 1995; Cornwall, 2009).

O transporte dos espermatozoides através do ducto epididimário acontece devido ao gradiente de pressão hidrostática diferencial entre as porções proximal e distal do ducto epididimário, além da atividade contrátil da parede do ducto (Cosentino e Cockett, 1986; Robaire e Viger, 1995; Klinefelter, 2002). O bom funcionamento destes mecanismos garantem um tempo do trânsito espermático adequado para a maturação espermática (Kempinas *et al.*, 1998; França *et al.*, 2005). O tempo que os espermatozoides demoram para passarem pelo ducto epididimário é espécie-específico, podendo variar de 3 a 15 dias (Cosentino e Cockett, 1986). Segundo Kempinas *et al.* (1998), o atraso no tempo de trânsito pelo epidídimo gera danos, mas se acelerado a fertilidade fica comprometida, pois o tempo disponível dos processos requeridos para a aquisição da capacidade fértil fica diminuído. A alteração do tempo de trânsito espermático também pode alterar a quantidade de espermatozoides disponíveis na ejaculação (Klinefelter, 2002).

## 2.7 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é um mecanismo celular que acontece quando a produção de radicais livres, espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio (ERO ou ERN) excedem a capacidade de defesa antioxidante celular (Schieber e Chandel, 2014). Os radicais livres são moléculas que apresentam um elétron não emparelhado no orbital externo, o que as torna,

geralmente, muito reativas com outras moléculas, incluindo lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (Godic *et al.*, 2014). São moléculas geradas endogenamente como consequência direta do metabolismo do oxigênio (Godic *et al.*, 2014). Alguns exemplos comuns de radicais livres encontrados em nosso organismo são o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e a hidroxila ( $OH^\cdot$ ) (Sharma *et al.*, 2014).

A defesa antioxidante do organismo tem como principal função remover os elementos tóxicos do organismo, ou seja, o excesso de EROs ou ERNs (Schieber e Chandel, 2014). As EROs podem atacar macromoléculas celulares, incluindo lipídios, proteínas e DNA, gerando uma série de patologias celulares, teciduais e sistêmicas (Sharma *et al.*, 2014). A geração de radicais livres e EROs dentro das células acontece não só na cadeia respiratória como também em processos de oxidação catalisados por oxidases citoplasmáticas e da matriz extracelular: no sistema microssomal que metaboliza xenobióticos, na síntese do colágeno e nos peroxissomos, porém, preferencialmente mitocôndrias (Sharma *et al.*, 2014). Situações não-fisiológicas também podem estimular a produção de radicais livres, como a exposição a irradiação ultravioleta e xenobióticos, que causam a redução incompleta do  $O_2$  (Godic *et al.*, 2014).

O sistema de proteção antioxidante do organismo é muito eficiente, as enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST) trabalham em conjunto para devolver o controle intracelular, minimizando efeitos deletérios (Sies, 1997; Navarro-Yepes *et al.*, 2014). Vale ressaltar que radicais livres em níveis controlados também podem atuar como moléculas sinalizadoras, fazendo a manutenção das funções fisiológicas, um processo chamado reação redox ou reação de oxidação–redução (Persson *et al.*, 2014; Schieber e Chandel, 2014). A reação redox envolve a transferência de elétrons entre espécies químicas, como átomos, íons ou moléculas envolvidas na reação (Persson *et al.*, 2014; Schieber e Chandel, 2014).

A atuação conjunta das enzimas antioxidantes no organismo protege as células de danos irreversíveis. A SOD, principal limpadora de ROS, acelera a conversão do radical superóxido ( $O_2^-$ ) em  $O_2$  e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Lauterburg *et al.*, 1984; Deneke e Fanburg, 1989; Halliwell e Gutteridge, 1999; Limón-Pacheco e Gonsebatt, 2009). A CAT utiliza o  $H_2O_2$  gerado por outras enzimas na organela, como a SOD, para oxidar outros substratos, pela reação “peroxidativa” (Lauterburg *et al.*, 1984; Deneke e Fanburg, 1989; Halliwell e Gutteridge, 1999; Limón-Pacheco e Gonsebatt, 2009). Além disso, quando um excesso de  $H_2O_2$  acumula-se na célula, a catalase o converte em  $H_2O$  por meio da reação:  $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$  (Lauterburg *et al.*, 1984; Deneke e Fanburg, 1989; Halliwell e Gutteridge, 1999; Limón-Pacheco e Gonsebatt,

2009). A GST atua como segunda linha de defesa, sendo responsável pela destoxificação celular, através da redução da glutathiona (GSH) pela conjugação a xenobióticos (Lauterburg *et al.*, 1984; Deneke e Fanburg, 1989; Halliwell e Gutteridge, 1999; Limón-Pacheco e Gonsebatt, 2009).

Reações como a de oxidação de gorduras (lipídica) no organismo têm sido estudadas e associadas a patologias humanas (Kehrer, 1993). Um importante marcador de estresse oxidativo, gerado como produto da oxidação lipídica, é o malondialdeído (MDA) (Sevanian e Hochstein, 1985; Slater *et al.*, 1987; Kubow, 1992). Assim, determiná-lo é importante para a quantificação da peroxidação lipídica no tecido estudado (Janero, 1990). O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa, inorgânica e incolor, importante para a realização de diversos eventos fisiológicos, como a sinalização (Gilio *et al.*, 2008). Nos testículos o NO é essencial, pois atua no controle da dinâmica dos complexos juncionais da barreira de célula de Sertoli, que protege as células germinativas, garantindo o bom funcionamento da espermatogênese (Gilio *et al.*, 2008).

Dados na literatura comprovam que a exposição a diversos agentes externos gera espécies reativas de oxigênio, diminui a atividade das enzimas antioxidantes e aumenta a peroxidação lipídica, causando estresse oxidativo testicular em animais experimentais (Reddy *et al.*, 2011; Fallahi *et al.*, 2015). Nos testículos, o estresse oxidativo pode ocasionar diversas alterações negativas, na maioria das vezes irreversíveis, como a infertilidade (Reddy *et al.*, 2011). Em concentrações adequadas, as espécies reativas ajudam na capacitação, motilidade e fertilidade dos espermatozoides, já em altas concentrações leva a perda da motilidade e disfunção das organelas (Fallahi *et al.*, 2015).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivos gerais**

Avaliar sistematicamente, dados na literatura que mostrem qual composto de isoflavona é mais consumido e quais os efeitos das isoflavonas da soja nos testículos. Além disso, avaliar o impacto do consumo das bebidas lácteas de soja (transgênica e não transgênica) e leite de vaca por camundongos Balb C adultos, durante 42 dias, nos testículos e epidídimos.

#### **3.2 Objetivos específicos**

##### **3.2.1 Revisão sistemática**

- Avaliar quais alterações ocorrem nos testículos após a absorção das isoflavonas;

- Determinar qual composto de isoflavonas, conjugado ou isolado, é mais consumido;
- Identificar quais são as principais patologias encontradas pela ação das isoflavonas nos testículos.

### 3.2.2 Testículo:

- Obter os valores biométricos corporais e testiculares;
- Calcular os índices gonadossomático (IGS), parenquimossomático (IPS), tubulossomático (ITS), epiteliossomático (IES) e Leydigossomático (ILS);
- Mensurar o diâmetro dos túbulos seminíferos, a altura do epitélio seminífero e o diâmetro do lume;
- Calcular o comprimento total dos túbulos seminíferos por testículo e por grama de testículo;
- Obter a proporção e volume dos componentes tubulares e intertubulares;
- Calcular a área tubular, luminal e do epitélio seminífero;
- Calcular o diâmetro, volume nuclear e número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo;
- Realizar a contagem da população celular de túbulos no estágio I do ciclo do epitélio seminífero e obter as razões entre os tipos celulares;
- Calcular o número de células de Sertoli por testículo e por grama de testículo, bem como a capacidade total de suporte dessas células;
- Calcular o rendimento geral da espermatogênese;
- Realizar avaliação histopatológica do testículo;
- Determinar a atividade das enzimas antioxidantes: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione S-transferase (GST);
- Determinar a atividade do malondialdeído (MDA), um dos produtos da peroxidação lipídica;
- Mensurar atividade do óxido nítrico (ON).

### 3.2.3 Epidídimo:

- Obter os valores biométricos epididimários;
- Avaliar a histomorfometria epididimária (diâmetro tubular e do lume e da altura do epitélio);
- Realizar avaliação histopatológica do epidídimo.

#### 3.2.4 Bebida láctea de soja e leite de vaca:

- Analisar a capacidade antioxidante das bebidas lácteas de soja e do leite de vaca (Sequestro por DPPH).

#### 3.2.5 Sorologia

- Determinar a concentração da testosterona sérica.

#### 4. REFERÊNCIAS

- AHLUWALIA, V.K.; BHASIN, M.M.; SESHADRI, T.R. Isoflavones of soybeans. *Current Science*, 22:263-265, 1953.
- AKINGBEMI, B.T.; BRADEN, T.D.; KEMPPAINEN, B.W.; HANCOCK, K.D.; SHERRILL, J.D.; COOK, S.J.; HE, X.; SUPKO, J.G. Exposure to Phytoestrogens in the Perinatal Period Affects Androgen Secretion by Testicular Leydig Cells in the Adult Rat. *Endocrinology*, 148(9):4475-4488, 2015.
- ALDERCREUTZ, H. Phytoestrogens and cancer. *Lancet Oncology*, 3(6):364-373, 2002.
- APPLEGATE, C.C.; ROWLES, J.L.; RANARD, K.M.; JEON, S.; ERDMAN, J.W. Soy Consumption and the Risk of Prostate Cancer: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*, 10(1):40, 2018.
- BAY, K.; ASKLUND, C.; SKAKKEBAEK, N.E.; ANDERSSON, A.M. Testicular dysgenesis syndrome: possible role of endocrine disrupters. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism*, 20:77-90, 2006.
- BOUTAS, I.; KONTOGEORGI, A.; DIMITRAKAKIS, C.; KALANTARIDOU, S.N. Soy Isoflavones and Breast Cancer Risk: A Meta-analysis. *In Vivo*, 36(2):556-562, 2022.
- BRANCA, F.; LORENZETTI, S. Health effects of phytoestrogens. *Forum Nutrition*, 5:110-111, 2005.
- BU, L.; SETCHELL, K.D.; LEPHART, E.D. Influences of dietary soy isoflavones on metabolism but not nociception and stress hormone responses in ovariectomized female rats. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 26:3-8, 2005.
- BUSBY, M.G.; JEFFCOAT, A.R.; BLOEDON, L.T.; KOCH, M.A.; BLACK, T.; DIX, K.J.; HEIZER, W.D.; THOMAS, B.F.; HILL, J.M.; CROWELL, J.A.; ZEISEL, S.H. Clinical characteristics and pharmacokinetics of purified soy isoflavones: single-dose administration to healthy men. *American Journal of Clinical Nutrition*, 75:126-136, 2002.
- CARLSEN, E.; GIWERCMAN, A.; KEIDING, N.; SKAKKEBAEK, N. E. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ Journals*, 305:609-613, 1992.
- CEDERROTH, C.R.; ZIMMERMANN, C.; BENY, J.L.; SCHAAD, O.; COMBEPINE, C.; DESCOMBES, P.; DOERGE, D.R.; PRALONG, F.P.; VASSALLI, J.D.; NEF, S. "Potential detrimental effects of a phytoestrogen-rich diet on male fertility in mice," *Molecular and Cellular Endocrinology*, 321:152-160, 2010.
- CHAVARRO, J.E.; TOTH, T.L.; SADIO, S.M.; HAUSER, R. Soy Food and Isoflavone Intake in Relation to Semen Quality Parameters Among Men From an Infertility Clinic Comment. *Human Reproduction*, 23(11):2584-2590, 2008.
- COSENTINO, M.J. and COCKETT, A.T.K. Review Article: Structure and Function of the Epididymis. *Urological Research*, 14:229-240, 1986.

- CORNWALL, G.A. New insights into epididymal biology and function. *Human Reproduction Update*, 15:21-27, 2009.
- COTRONEO, M.S.; WANG, J.; ELTOUM, I.A.; LAMARTINIERE, C.A. Sex steroid receptor regulation by genistein in the prepubertal rat uterus. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 173(1-2):135-145, 2001.
- DADOUNE, J; DEMOULIN, A. Structure and functions of testis. In: THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M.C. HUNTER, R. H. F. Reproduction in mammals and man. *Paris: Ellipses*, 13:227-255, 1993.
- DENEKE, S. M.; FANBURG, B.L. Regulation of cellular glutathione. *American Journal of Physiology*, 257:163–173, 1989.
- DIEL, P.; SCHMIDT, S.; VOLLMER, G. In vivo test systems for the quantitative and qualitative analysis of the biological activity of phytoestrogens. *Journal of Chromatography B*, 777(1-2):191-202, 2002.
- DIETERICH, S.; BIELIGK, U.; BEULICH, K.; HASENFUSS, G.; PRESTLE, J. ELDRIDGE, A.C. Determination of isoflavones in soybean flours, protein-concentrates, and isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(2):353–355, 1982.
- ELDRIDGE, A. C. Determination of isoflavones in soybean flours, protein concentrates, and isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(2):353-355, 1982.
- FALLAHI, S.; RAJAEI, M.; MALEKZADEH, K.; KALANTAR, S. M. Would *Phoenix Dactyflera* Pollen (palm seed) be considered as a treatment agent against males infertility? A systematic review. *Electronic Physicia*, 7(8):1590-1596, 2015.
- FAQI, A. S.; JOHNSON, W. D.; MORRISSEY, R. L.; MCCORMICK, D. L. Reproductive toxicity assessment of chronic dietary exposure to soy isoflavones in male rats. *Reproductive Toxicology*, 18(4):605–611, 2004.
- FARMAKALIDIS, E.; HATHCOCK, J.N.; MURPHY, P.A. Oestrogenic potency of genistin and daidzin in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 23:741-5, 1985.
- FLACHOWSKY, G.; HÜNERBERG, M.; MEYER, U.; KAMMERER, D.R.; CARLE, R.; GOERKE, M.; EKLUND, M. Isoflavone concentration of soybean meal from various origins and transfer of isoflavones into milk of dairy cows. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 6:449–456, 2011.
- FOLMAN, Y.; POPE, G.S. The interaction in the immature mouse of potent oestrogens with coumestrol, genistein and other uterovaginitrophic compounds of low potency. *Journal of Endocrinology*, 34:215-218, 1966.
- FRANÇA, L.R.; AVELAR, G.F.; ALMEIDA, F.F. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology* 63(2): 300-18, 2005.
- FRANÇA, L.R.; HESS, R. A.; DUFOUR, J. M.; HOFMANN, M. C.; GRISWOLD, M. D. The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity. *Andrology*, 4:189-212, 2016.

- FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D. The testis of domestic mammals. In: Martinez-Garcia, F. & Regadera, J. (eds). Male reproduction - a multidisciplinary overview. Madrid, *Churchill Communications*, 198-219, 1998.
- FRANCO, G. Tabela de composição química de alimentos. 7ª ed. Rio de Janeiro: Ed. *Livraria Atheneu*, 1986.
- FUKUTAKE, M.; TAKAHASHI, M.; ISHIDA, K.; KAWAMURA, H.; SUGIMURA, T.; WAKABAYASHI, K. Quantification of genistein and genistin in soybeans and soybean products. *Food and Chemical Toxicology*, 34(5):457-461, 1996.
- GANMAA, X.M; LI, L.Q; QIN, P.Y; WANG, L.Q; QIN, K; HOSHI, A.; SATO. Is milk responsible for male reproductive disorders? *Medical Hypotheses*, 57:510-514, 2001.
- GILIO, J.M.; BORELLA, M.I.; CAMARGO, A.C. M.; SILVA, C.A. A variação dos níveis de óxido nítrico relacionada ao controle da dinâmica dos complexos juncionais no epitélio seminífero de camundongos. *ConScientiae Saúde*, 7(1):69-76, 2008.
- GODIC, A.; POLJŠAK, B.; ADAMIC, M.; DAHMANE, R. The Role of Antioxidants in Skin Cancer Prevention and Treatment. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014:1-6, 2014.
- GUAN, L.; HUANG, Y.; CHEN, Z.Y. Developmental and Reproductive Toxicity of Soybean Isoflavones to Immature SD Rats. *Biomedical and Environmental Sciences*, 21:197-204, 2008.
- GUTENDORF, B.; WESTENDORF, J. Comparison of an array of *in vitro* assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens. *Toxicology*, 166(1-2):79-89, 2001.
- HALLIWELL, B; J. GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. *Oxford University Press*, New York, 105-245, 1999.
- HAMILTON, K.J.; ARAO, Y.; & KORACH, K. S. Estrogen hormone physiology: reproductive findings from estrogen receptor mutant mice. *Reproductive Biology*, 14(1):3-8, 2014.
- HERMO L, ROBAIRE B. Epididymal cell types and their functions. In: Robaire B, Hinton BT, editors. The Epididymis- from molecules to clinical practice. *New York: Kluwer Academic/Plenum Publisher*, 81-102, 2002.
- HESS, R.A.; BUNICK, D.; BAHR, J. Oestrogen, its receptors and function in the male reproductive tract – review. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 178(1-2):29-38, 2001A.
- HESS, R.A.; ZHOU, Q; NIE, R.; OLIVEIRA C.; CHO, H.; NAKAIA, M.; CARNES, K. Estrogens and epididymal function. *Reproduction, Fertility and Development*, 13(4):273-83, 2001B.
- JANERO, D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 9:515-540, 1990.
- JEFFERSON, W.N.; PADILLA-BANKS, E.; NEWBOLD, R. R. Adverse effects on female development and reproduction in CD-1 mice following neonatal exposure to the phytoestrogen genistein at environmentally relevant doses. *Biology of Reproduction*. 73(4):798-806, 2005.

- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
- KAILASAPATHY, K. Chemical composition, physical and functional properties of milk and milk ingredients. *Dairy Processing & Quality Assurance*, 1:75-103, 2008.
- KALTENBACH, C.C.; DUNN, T.G. Endocrinologia da reprodução. In: HAFEZ, E. S. E. Reprodução animal. São Paulo: Editora Manole, 5:95-127, 1982.
- KEHRER, J.P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical Reviews in Toxicology*, Boca Raton, 23(1):22, 1993.
- KENNEDY, A.R. The evidence for soybean products as cancer preventive agents. *Journal of Nutrition*, 125(3):733S-743S, 1995.
- KEMPINAS, W.G.; SUAREZ, J.D.; ROBERTS, N.L.; STRADER, L.; FERRELL, J.; GOLDMAN, J.M.; KLINEFELTER, G.R. Rat epididymal sperm quantity, quality and transit time after guanethidine-induced sympathectomy. *Biology Reproduction*. 59:890-896, 1998.
- KLINEFELTER, G.R. Actions of toxicants on the structure and function of the epididymis. In: 29 Robaire B, Hinton BT, editors. The Epididymis – from molecules to clinical practice. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publisher, 353-369, 2002.
- KREIGER, D.T.; PORLOW, M.J.; GIBSON, M.J.; DAVIS, T.F. Brain grafts reverse hypogonadism of gonadotropin releasing hormone deficiency. *Nature*, 298:468-471, 1982.
- KUBOW, S. Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation products in foods. *Free Radical Biology and Medicine*, New York, 12(1):63-81, 1992.
- KUIPER, G.G.; CARLSSON, B.O.; GRANDIEN, K.A.J.; ENMARK, E., HÄGGBLAD, J.; NILSSON, S.; & GUSTAFSSON, J.A. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Endocrinology*, 138(3):863-870, 1997.
- KUIPER, G.G.; LEMMEN, J.G.; CARLSSON, B.O.; CORTON, J.C.; SAFE, S.H.; VAN DER SAAG, P.T.; & GUSTAFSSON, J.A. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor  $\beta$ . *Endocrinology*, 139(10):4252-4263, 1998.
- LAUTERBURG, B.H.; ADAMS, J.D.; MITCHELL, J.R. Hepatic glutathione homeostasis in the rat: efflux accounts for glutathione turnover. *Hepatology*, 4(4):586-590, 1984.
- LAZARI, M.F.M.; LUCAS, T.F.G.; YASUHARA, F.; GOMES, G.R.O.; SIU, E.R.; ROYER, C.; PORTO, C.S. Estrogen receptors and function in the male reproductive system. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 53:923-933, 2009.
- LIMA, G.D.A.; SERTORIO, M.N.; SOUZA, A.C. F.; MENEZES, T.P.; MOURO, V.G.S.; GONÇALVES, N.M.; OLIVEIRA, G.M.; HENRY, M.; MACHADO-NEVES, M. Fertility in male rats: Disentangling adverse effects of arsenic compounds. *Reproductive Toxicology*, 78:130-140, 2018.

- LIMÓN-PACHECO, L.; GONSEBATT, M.E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research*, 674:137–14, 2009.
- LIU, Y.; CAI, J.; ZHANG, F. Functional comparison of breast milk, cow milk and goat milk based on changes in the intestinal flora of mice. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 150:1-8, 2021.
- LIU, Y.; LIANG, Y.; WANG, S.; TARIQUE, I.; VISTRO, W.A.; ZHANG, H.; HASEEB, A.; GANDAH, N.S.; IQBAL, A.; AN, T.; YANG, H.; CHEN, Q.; YANG, P. Identification and characterization of telocytes in rat testis. *Aging (Albany NY)*, 11(15):5757-5768, 2019.
- MCCORMICK, D.L.; JOHNSON, W.D.; BOSLAND, M.C.; LUBET, R.A.; STEELE, V.E. Chemoprevention of rat prostate carcinogenesis by soy isoflavones and by Bowman-Birk inhibitor. *Nutrition and Cancer*, 57(2):184-93, 2007.
- MEDIGOVIĆ, I.M.; ŽIVANOVIĆ, J.B.; AJDŽANOVIĆ, V.Z.; NIKOLIĆ-KOKIĆ, A.L.; STANKOVIĆ, S.D.; TRIFUNOVIĆ, S.L.; MILOŠEVIĆ, V.L.J.; NESTOROVIĆ, N.M. Effects of soy phytoestrogens on pituitary-ovarian function in middle-aged female rats. *Endocrine*, 50(3):764-76, 2015.
- MEDEIROS, L.C.S.; SPERIDIÃO, P.G.L.; SDEPANIAN, V.L.; FAGUNDES-NETO, U.; MORAIS, M.B. Ingestão de nutrientes e estado nutricional de crianças em dieta isenta de leite de vaca e derivados. *Jornal de Pediatria*, 80(5):363-370, 2004.
- MOLLAKHALILI M.N.; ARAB, M.; & ZARE, L. Harmful compounds of soy milk: characterization and reduction strategies. *Journal of Food Science and Technology*, 59:3723-3732, 2022.
- MORAIS, A.C.T.; BALARINI, M.K.B.; MENEZES, T.P.; FERRAZ, F.S.; GOMES, M.L.; MORAIS, D.B.; PAULA, T.A.R.; MATTA, S.L.P. Germ cells and the seminiferous epithelium cycle in the wild rodent *Oxymycterus rufus* (Rodentia: Cricetidae). *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 11(4):61-71, 2016.
- MESSINA, M. Impact of Soy Foods on the Development of Breast Cancer and the Prognosis of Breast Cancer Patients. *Forsch Komplementmed*, 23(2):75-80, 2016
- NAJAF, N.; GHAZANFARPOUR, M.N. Effect of phytoestrogens on sexual function in menopausal women: a systematic review and meta-analysis. *Climacteric*, 21(5):437-445, 2018.
- NAVARRO, M.C. Mecanismo de acción de las isoflavonas. *Ginecología y Obstetricia Clínica*, 6:159-165, 2005.
- NAVARRO-YEPES, J.; BURNS, M.; ANANDHAN, A.; KHALIMONCHUK, O.; RAZO, L.M. D.; QUINTANILLA-VEGA, B.; PAPPA, A.; PANAYIOTIDIS, M.I.; FRANCO, R. Oxidative Stress, Redox Signaling, and Autophagy: Cell Death Versus Survival. *Antioxidants and Redox Signaling*, 21(1):66-85, 2014.
- NAWAR, W.W. Lipids. In: FENNEMA, C.R. (Ed.). Food chemistry. *New York: Marcel Dekker*, 139-244, 1985.

- PEREIRA, F.P.; SANTOS, O.A.R.; RESENDE, R.C.M.; & HENRIQUES, B.O. Avaliação comparativa da composição nutricional do leite de soja em relação ao leite de vaca com e sem lactose. *Revista Acadêmica Conecta FASF*, 2(1), 2017.
- PERL, D.P.; LITTLE, B.N. Acridine orange - nucleic acid fluorescence, its use in routine diagnostic muscle biopsies. *Archives of Neurology*, 37:641-644, 1980.
- PERSSON, T.; POPESCU, B.O. CEDAZO-MINGUEZ, A. Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-11, 2014.
- PROSSNITZ, E.R.; BARTON, M. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nature Reviews Endocrinology*, 7(12):715-26, 2011.
- REDDY, P.S.; RANI, G.P.; SAINATH, S.B.; MEENA, R.; SUPRIYA, C. Protective effects of N-acetylcysteine against arsenic-induced oxidative stress and reprotoxicity in male mice. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 25:247-53, 2011.
- RENHE, I. R.T. O papel do leite na nutrição. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 63(363):36-43, 2008.
- RETANA-MÁRQUEZ, S.; HERNÁNDEZ, H.; FLORES, J. A.; MUÑOZ-GUTIÉRREZ, M.; DUARTE, G.; VIELMA, J.; FITZ-RODRÍGUEZ, G.; FERNÁNDEZ, I. G.; KELLER, M.; DELGADILLO, J.A. Effects of phytoestrogens on mammalian reproductive physiology. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15(1):129-145, 2012.
- ROBAIRE, B.; VIGER, R.S. Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biology of Reproduction*, 52(2):226-36, 1995.
- RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R.A.; SINHA HIKIM, A.P.; CLEGG, E.D. Mammalian spermatogenesis. *In: RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R. A.; SINHA HIKIM, A.P.; CLEGG, E.D. (Eds). Histological and histopathological evaluation of the testis. Bolesta: Cache River Press*, 1-40, 1990.
- RUSSELL, L.D.; GRISWOLD, M.D. The Sertoli cell. (ed) Clearwater. *Cache River Press, Florida*, 1-37, 1993.
- SCHAIRER, C; LUBIN, J.; TROISI, R.; STURGEON, S.; BRINTON, L.; HOOVER, R. Menopausal Estrogen and Estrogen-Progestin Replacement Therapy and Breast Cancer Risk. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 283(4):485-491, 2000.
- SCHIEBER, M.; CHANDEL, N.S. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. Review. *Current Biology*, 24:453-462, 2014.
- SEDIYAMA, T.; SILVA, F.; BORÉM, A. Soja: do plantio à colheita. Viçosa: Editora UFV, 2015.
- SETCHELL, B.P. Male reproductive organs and semen. *In: Cupps, P. T. (Ed): Reproduction in domestic animals. Academic Press, San Diego*, 6(4):221-250, 1991.
- SETCHELL, K.D. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68:1333s-1346s, 1998.

- SETCHELL, K.D.; COLE, S.J. Variations in isoflavone levels in soy foods and soy protein isolates and issues related to isoflavone databases and food labeling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(14):4146-55, 2003.
- SETCHELL, K.D.R.; ZIMMER-NECHEMIAS, L.; CAI, J.; HEUBI, J.E. Exposure of infants to phytoestrogens from soy-based infant formula. *The Lancet*, 350:23-7, 1997.
- SETCHELL, K.D.R.; BROWN, N.M.; ZIMMER-NECHEMIAS, L.; RASHEAR, W.T.; WOLFE, B.E.; KIRSCHNER, A.S.; HEUBI, J.E. "Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal-metabolism for bioavailability," *American Journal of Clinical Nutrition*, 76(2):447-453. 2002.
- SEVANIAN, A., HOCHSTEIN, P. Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Annual Reviews of Nutrition*, Palo Alto, 5:365-390, 1985.
- SGARBIERI, V.C.; GARRUTI, E.C.; GUZMÁN, E.C. Soybeans as an extender of common beans. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 58(3):522-526, 1981.
- SHARMA, T.; BANERJEE, B.D.; YADAV, C.S.; GUPTA, P.; SHARMA, S. Heavy metal levels in adolescent and maternal blood: association with risk of hypospadias. *ISRN Pediatrics*, 1-5, 2014.
- SHARPE, R.M.; MARTIN, B.; MORRIS, K.; GREIG, I.; MCKINNELL, C.; MCNEILLY, A.S.; WALKER, M. Infant feeding with soy formula milk: effects on the testis and on blood testosterone levels in marmoset monkeys during the period of neonatal testicular activity. *Human Reproduction*, 17:1692-1703, 2002.
- SHERILL, J.D.; SPARKS, M.; DENNIS, J.; MANSOUR, M.; KEMPPAINEN, B.W.; BARTOL, F.F.; MORRISON, E.E.; AKINGBEMI, B.T. Developmental Exposures of Male Rats to Soy Isoflavones Impact Leydig. *Biology of Reproduction*, 83:488-501, 2010.
- SHUM, W.W.; DA SILVA, N.; BROWN, D.; BRETON, S. Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk. *Journal of Experimental Biology*. 212:1753-61, 2009.
- SIES, H. Oxidative stress. *London, Academic Press*, 507, 1997.
- SKINNER, M. Cell-cell interactions in the testis. *Endocrine Reviews*, 12:45-77, 1991.
- SLATER, T.F., CHEESEMAN, K.H., DAVIES, M.J., PROUDFOOT, K., XIU, W. Free radical mechanisms in relation to tissue injury. *Proceedings of the Nutrition Society*, London, 46(1):1-12, 1987.
- SRILATHA, B.; ADAIKAN, P.G. Oestrogen-androgen crosstalk in the pathophysiology of erectile dysfunction. *Asian Journal of Andrology*, 5(4):307-13, 2003.
- STRAUSS, L.; SANTTI, R.; SAARINEN, N.; STRENG, T.; JOSHI, S.; MAKELA, S. Dietary phytoestrogens and their role in hormonally dependent disease. *Toxicology Letters*, 102(103):349-354, 1998.
- STROM, S.S.; YAMAMURA, Y.; DUPHORNE, C.M.; SPITZ, M.R.; BABAIAN, R.J.; PILLOW, P.C.; HURSTING, S.D. Phytoestrogen intake and prostate cancer: a case-control study using a new database. *Nutrition and Cancer*, 33:20-25, 1999.

- SULLIVAN R. Male fertility markers, myth or reality. *Animal Reproduction Science*, 82-83:341-347, 2004.
- TAN, K.A.; WALKER, M.; MORRIS, K.; GREIG, I.; MASON, J.I.; SHARPE, R.M. Infant feeding with soy formula milk: effects on puberty progression, reproductive function and testicular cell numbers in marmoset monkeys in adulthood. *Human Reproduction*, 21:896–904, 2006.
- THOMPSON, L.U.; SEIDL, M.M.; RICKARD, S.E.; ORCHESON, L.J.; FONG, H. Antitumorigenic effect of a mammalian lignan precursor from flaxseed. *Nutrition and Cancer*, 26:159-165, 1996.
- TROLL, W.; WIESNER, R. Protease inhibitors: possible anticarcinogenic inedible seeds. *Prostate*, 4:345–9, 1983.
- VENTURINI, K.S.; SARCINELLI, M.F.; SILVA, L.C da. Características do leite. *Boletim Técnico, Programa Institucional de Extensão, Pie-UFES*,1007(6), 2007.
- VERNETTI, F.J. História e importância da soja no Brasil. *A Lavoura*, 81:21-24, 1977.
- WISNIEWSKI, A.B.; KLEIN, S.L.; LAKSHMANAN, Y.; GEARHART, J.P. Exposure to genistein during gestation and lactation demasculinizes the reproductive system in rats. *Journal of Urology*, 169:1582-1586, 2003.
- WOLF, W.D.; COWAN, J.C. Soybean as a protein source. London: Butterworth, 150, 1971.
- ZHOU, J.R.; LI, L.; PAN, W. Dietary soy and tea combinations for prevention of breast and prostate cancers by targeting metabolic syndrome elements in mice. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 86(3):882-8, 2007.
- YENEW, C.; TADELE, F.; MINUYE, B.; SISAY, E.; ASMAMAW, T.; MULATU, S.; & DEMISSIE, B. Raw cow milk nutritional content and microbiological quality predictors of South Gondar zone dairy farmers in Ethiopia. *Heliyon*, 8(10):1-6, 2022.
- YILDIZ, F. Phytoestrogens in Functional Foods. *Taylor & Francis. Ltd*, 3(5):210-211, 2005.

## CAPÍTULO 1

---

\* **Artigo publicado:** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine

Hindawi

Volume 2021, Article ID 8853172, 14 pages

<https://doi.org/10.1155/2021/8853172>

---

### **Relevância da Absorção das Isoflavonas na Função Testicular: Uma Revisão Sistemática de Evidências Pré-clínicas**

**Amanda Alves Lozi<sup>1</sup>, Sérgio Luis Pinto da Matta<sup>1</sup>, Mariáurea Matias Sarandy<sup>1</sup>, Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo<sup>2</sup>, Diane Costa Araujo<sup>1</sup>, Rômulo Dias Novaes<sup>3</sup> and Reggiani Vilela Gonçalves<sup>2</sup>**

*1-Department of General Biology, Federal University of Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil*

*2-Department of Animal Biology, Federal University of Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil*

*3-Department of Structural Biology, Federal University of Alfenas, Alfenas, Minas Gerais, Brazil*

Correspondence should be addressed to Amanda Alves Lozi; [amandaalveslozi@gmail.com](mailto:amandaalveslozi@gmail.com) and Reggiani Vilela Gonçalves; [reggysvilela@yahoo.com.br](mailto:reggysvilela@yahoo.com.br)

### **RESUMO**

A isoflavona é um fitoestrogênio encontrado em diferentes tipos de alimentos ingeridos pelos seres humanos, que podem atuar como desreguladores endócrinos levando à disfunção testicular. Atualmente, dados fragmentados sobre a ação desse composto nos testículos dificultam a avaliação de seus efeitos para definir uma dose segura. Assim, revisamos sistematicamente as evidências pré-clínicas do impacto da isoflavona na função testicular. Também determinamos qual forma (aglicona ou glicosilada) foi a mais utilizada, o que nos permitiu entender os principais processos biológicos envolvidos na função testicular após a exposição à isoflavonas. Esta revisão sistemática foi realizada de acordo com as diretrizes do PRISMA, utilizando uma busca estruturada nas bases de dados biomédicas MEDLINE (PubMed), Scopus e Web of Science, recuperando e analisando 22 estudos originais. A análise de viés e a qualidade dos estudos foram avaliadas pelos critérios descritos na ferramenta de risco de viés desenvolvida pelo SYRCLE (Systematic Review Center for Laboratory Animal Experimentation). As isoflavonas agliconas e glicosiladas mostraram-se prejudiciais à saúde reprodutiva masculina, sendo que as glicosiladas nas doses de 50, 100, 146, 200, 300, 500 e 600 mg/kg, além de 190 e 1000 mg/L, mostraram-se mais danosas. As principais patologias testiculares decorrentes do uso de isoflavonas estão associadas às células de Leydig, como alterações nas funções moleculares e componentes celulares. As isoflavonas mais utilizadas nos

trabalhos avaliados nesta revisão foi a genisteína/daidzeína conjugadas. O consumo de altas doses de isoflavonas promove alterações no funcionamento das células de Leydig, induzindo alterações testiculares e levando à infertilidade em modelos murinos.

Palavras-chave: Isoflavona. Fitoestrogênios. Reprodução. Testículos. Modelo murinho. Revisão sistemática.

### ABSTRACT

Isoflavone is a phytoestrogen found in different types of foods eaten by humans, which can act as endocrine disruptor leading to testicular dysfunction. Currently, fragmented data on the action of this compound on the testicles make it difficult to assess its effects to define a safe dose. Thus, we systematically reviewed the preclinical evidence of isoflavone impact on testicular function. We also determined which form (aglycone or glycosylated) was the most used, which allowed us to understand the main biological processes involved in testicular function after exposure to isoflavones. This systematic review was performed according to PRISMA guidelines using a structured search in the biomedical databases MEDLINE (PubMed), Scopus, and Web of Science, retrieving and analyzing 22 original studies. An analysis of bias and the quality of the studies was assessed using the criteria prescribed in the risk of bias tool developed by SYRCLE (Systematic Review Center for Laboratory Animal Experimentation). The aglycone and glycosylated isoflavones were harmful to male reproductive health, and the glycosylated ones at doses of 50, 100, 146, 200, 300, 500, and 600 mg/kg, in addition to 190 and 1000 mg/L, marveled more harmful. The main testicular pathologies resulting from the use of isoflavones are associated with Leydig cells, such as changes in molecular functions and cellular components. The most used isoflavones in the studies evaluated in this review were conjugated genistein/daidzein. The consumption of high doses of isoflavones promotes alterations in the functioning of Leydig cells, inducing testicular alterations and leading to infertility in murine models.

Keywords: Isoflavone. Phytoestrogens. Reproduction. Testicles.; Murine model. Systematic review.

## 1. INTRODUÇÃO

Os fitoestrógenos, especialmente as isoflavonas da soja, são compostos naturais não esteroides de origem vegetal encontrados principalmente na família Fabaceae [1]. A estrutura química e a função das isoflavonas são semelhantes ao estrogênio e, portanto, seu efeito terapêutico é estudado em uma variedade de doenças dependentes de estrogênio, como menopausa, doenças cardiovasculares e osteoporose [1]. As isoflavonas como genisteína, daidzeína, formononetina, biochanina A e equol podem ser encontradas em diferentes tipos de alimentos, como leguminosas (especialmente a soja), grãos inteiros e algumas sementes usadas na dieta humana [2]. Muitos alimentos possuem diferentes tipos de isoflavonas conjugadas em sua composição, sendo uma das principais fontes de exposição dos seres humanos a este composto [2]. Porém, com a descoberta dos efeitos das isoflavonas no organismo, tornou-se possível o consumo de isoflavonas isoladas produzidas em laboratório [2].

Quando as isoflavonas são absorvidas, podem se ligar a receptores específicos de estrogênio [3] e atuar como hormônios femininos, alterando principalmente os níveis de hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH) e testosterona [4, 5]. Em mulheres, as isoflavonas, genisteína e daidzeína, exibem efeitos benéficos no eixo hipotálamo-hipófise-ovário e no ciclo ovariano em ratas de meia-idade [5]. Embora a maioria dos estudos se concentre no efeito das isoflavonas no sistema reprodutor feminino, devido aos seus benefícios na redução dos sintomas da menopausa, há evidências de que a reprodução masculina pode ser afetada [6–10].

As isoflavonas da soja podem ser usadas para tratamento e prevenção de câncer de próstata [6–8]. As propriedades terapêuticas das isoflavonas podem justificar um aumento mundial no consumo de alimentos ricos nestes compostos nos últimos anos [9]. Porém, sua disponibilidade em cada tipo de alimento ou dentro de um mesmo grupo pode variar de acordo com a quantidade e duração da ingestão [2]. Por outro lado, há estudos relatando que o consumo de isoflavonas pode diminuir a produção de testosterona e a concentração de espermatozoides em humanos [8, 10] levando à infertilidade [11]. Embora existam estudos relacionados à ação das isoflavonas na função testicular [8, 12], dados fragmentados dificultam a definição das evidências atuais e impedem o entendimento dos principais mecanismos envolvidos no processo de exposição às isoflavonas. Atualmente, sabe-se que as isoflavonas atuam como desreguladores endócrinos, levando à disfunção testicular [8, 12, 13]. Uma vez no corpo, as isoflavonas podem se ligar aos receptores de estrogênio  $\alpha$  e  $\beta$  induzindo efeito estrogênico fraco [14] e efeito agonístico e/ou antagonista no  $\beta$ -estrogênio endógeno, através da competição pelos mesmos receptores de

androgênio [15]. Além disso, pode ocorrer uma inibição direta nas células germinativas ou uma alteração do eixo hipotálamo-hipófise [8]. As principais consequências da ativação desses mecanismos são alterações morfológicas que podem afetar negativamente o desempenho de processos essenciais para a formação de gametas masculinos viáveis [16, 17].

Embora acredite que as isoflavonas tenham diversos efeitos na função testicular [18], ainda não há consenso para definir a melhor dosagem, bem como os principais processos biológicos que envolvem o papel desse fitoestrógeno nos testículos. Portanto, este estudo avaliou a ação das isoflavonas na função testicular em modelos murinos e a relevância, positiva ou negativa, desse composto para a função sexual. Também, avaliamos a qualidade metodológica das evidências atuais, indicando as principais fontes de viés. Acreditamos que nossos achados possam aumentar o conhecimento sobre a ação das isoflavonas em processos biológicos que podem alterar a função testicular. As informações obtidas neste estudo podem indicar quais doses são seguras, evitando assim o consumo em quantidades prejudiciais à fertilidade masculina.

## **2. MATERIAL E METODOS**

### **2.1 Perguntas Norteadoras**

As principais questões a serem respondidas nesta revisão sistemática foram: quais alterações ocorrem nos testículos após a absorção das isoflavonas? Qual composto de isoflavonas, conjugado ou isolado, é mais consumido? Quais são as principais patologias encontradas pela ação das isoflavonas nos testículos?

### **2.2 Estratégia de Busca**

Todos os estudos incluídos nesta revisão sistemática foram selecionados de acordo com a diretriz padronizada PRISMA (Principais itens para relatar revisões sistemáticas e meta-análise) [19]. A revisão sistemática foi registrada no Registro Prospectivo Internacional de Revisões Sistemáticas (PROSPERO) (número de registro CRD42020156854) e pode ser acessada pelo site <https://www.crd.york.ac.uk/PROSPERO/>. Foram realizadas pesquisas bibliográficas nas bases de dados eletrônicas PubMed/MEDLINE (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), Scopus (<https://www.scopus.com/home.uri>) e Web of Science (<https://www-periodicos-capes-gov-br.ez35.periodicos.capes.gov.br>) no dia 24 de outubro de 2019, às 12h57. A estratégia de busca foi dividida em duas etapas: (1) busca direta

em bases de dados eletrônicas e (2) triagem indireta de listas de referência de todos os estudos identificados na busca direta.

As palavras-chave utilizadas como filtros de busca foram organizadas em três grupos: modelos animais, testículos e isoflavonas. Os estudos indexados foram inicialmente recuperados de filtros de pesquisa desenvolvidos para PubMed combinando palavras-chave e descritores MeSH padronizados (Títulos de assuntos médicos, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh>). Para detectar todos os estudos pré-clínicos in vivo, um filtro animal padronizado foi aplicado [20]. O comando [TIAB] (Título e Resumo) também foi aplicado para identificar registros publicados recentemente ainda em processo de indexação. Os mesmos descritores de pesquisa usados para testículos e isoflavonas foram estruturados de acordo com algoritmos de pesquisa específicos exigidos nos bancos de dados Scopus e Web of Science. O filtro animal do Scopus (palavra-chave animal (limitado a) foi usado neste banco de dados, e outro filtro animal foi criado para o Web of Science. Além disso, nenhum limite de idioma foi aplicado na pesquisa primária. Todos os estudos publicados até outubro de 2019 foram incluídos na revisão sistemática. A estratégia de busca é detalhada nos materiais complementares (Tabela S1).

### **2.3 Critérios de seleção**

Seguindo a estratégia PICOS (Population, Interventions, Comparison, Outcomes e Study design), os estudos que atenderam aos critérios foram incluídos nesta revisão sistemática. Dois revisores (AAL e DCA) realizaram a pesquisa bibliográfica, removeram artigos duplicados e selecionaram títulos e resumos em relação aos critérios de elegibilidade. Após a triagem inicial, os artigos para avaliação do texto completo, potencialmente relevantes, foram avaliados de forma independente quanto à elegibilidade por dois revisores (AAL e DCA). O teste kappa foi utilizado para seleção e extração de dados ( $\text{kappa} = 0,878$ ). As seleções foram comparadas e as inconsistências resolvidas em consulta com dois outros revisores (RVG e MMS). Todos os estudos que avaliaram os processos biológicos da ação das isoflavonas nos testículos de modelos murinos durante o período de desenvolvimento até a fase adulta ou apenas durante a fase adulta, foram incluídos em nossa pesquisa. Foram excluídos estudos com andrógenos, hormônios antagonistas ou avaliação da ação de outros compostos, como pesticidas, fungicidas, antiandrógenos, vitaminas e radiação. Estudos que avaliaram doenças em outros órgãos, que avaliaram apenas durante o período gestacional, tumores, fêmeas, que utilizaram apenas o epidídimo, espermatozoides e filhotes não foram incluídos nesta revisão sistemática. Estudos

*in vitro*, *in silico* e *ex vivo* em animais não-roedores e estudos que analisam doenças vasculares foram excluídos desta revisão. Estudos secundários (revisões de literatura, cartas ao editor, estudos de caso, comentários e editoriais) também foram excluídos.

Após a triagem, todos os estudos relevantes foram recuperados em texto completo e selecionados por elegibilidade. A elegibilidade foi revisada pelos pesquisadores e as divergências foram resolvidas por consenso. A lista de referências de cada estudo incluído foi revisada e rastreada manualmente para artigos adicionais [21]. Se algum documento foi adicionado, sua lista de referências também foi revisada ao final deste ciclo. Todos os resultados encontrados nos estudos foram submetidos à análise de enriquecimento Enrichr [22, 23].

## 2.4 Extração de dados

Três revisores independentes (AAL, MMS e RVG) extraíram os dados essenciais agrupados em cinco níveis descritivos como segue:

- (i) Características da publicação: autor, ano e país;
- (ii) Características do modelo animal: espécie, sexo, idade e peso;
- (iii) Intervenção: grupo controle, dose, frequência, via e tempo de administração;
- (iv) Principais resultados após o tratamento;
- (v) Desfechos secundários.

Quaisquer discordâncias sobre os dados extraídos foram resolvidas durante as discussões com três revisores adicionais (SLPM, FCSAM e RDN).

## 2.5 Análise de Viés

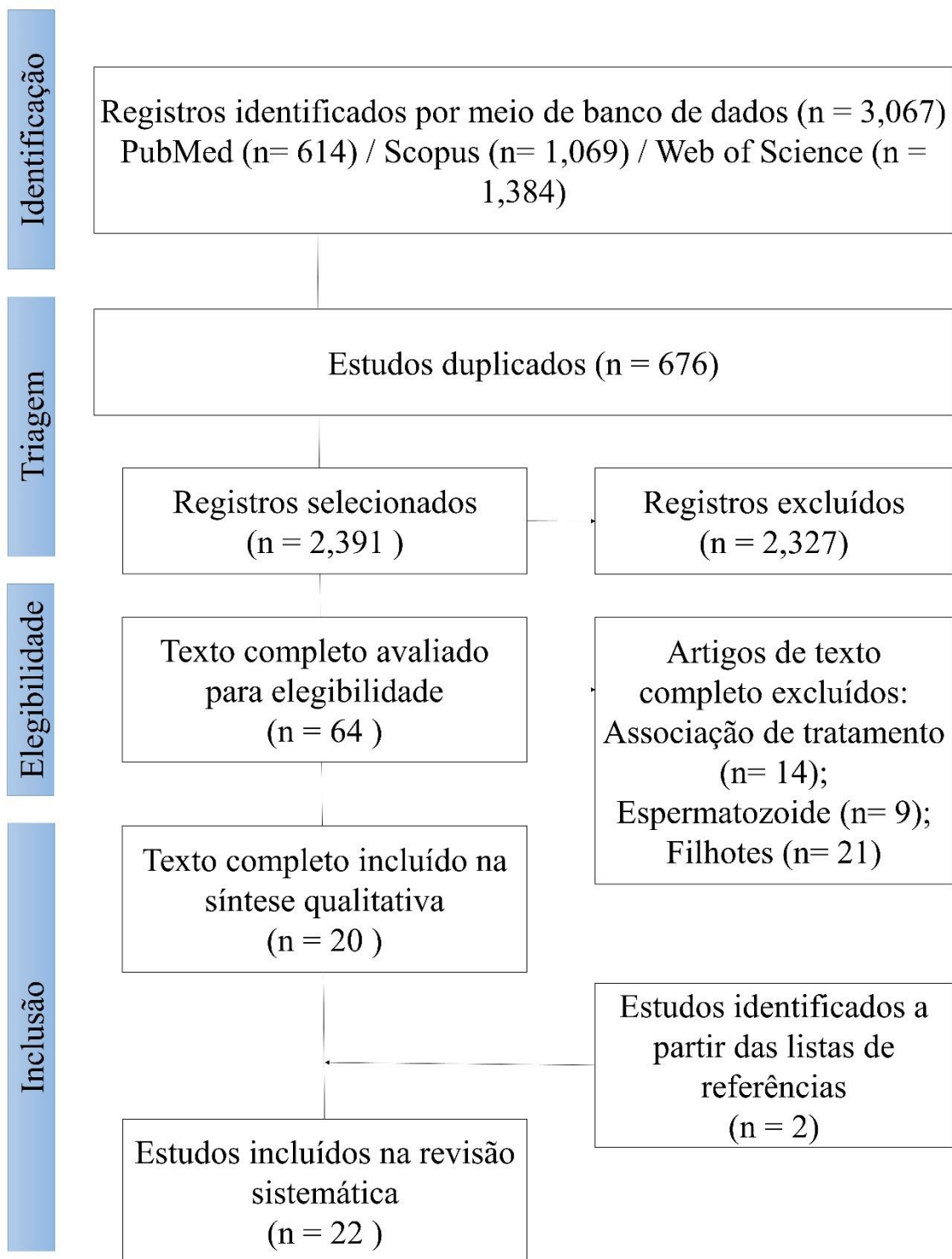
A qualidade dos estudos foi avaliada através da ferramenta de risco de viés (RoB) do SYRCLE (Centro de Revisão Sistemática para Experimentação com Animais de Laboratório) [24]. Os seguintes domínios metodológicos com base em RoB foram avaliados: **(1)** viés de seleção (geração de sequência aleatória, características de linha de base, ocultação de alocação), **(2)** viés de desempenho (alojamento aleatório e cegamento de cuidadores e / ou investigadores), **(3)** viés de detecção (avaliação de resultados aleatórios, mascaramento da avaliação de resultados), **(4)** viés de atrito (dados de resultados incompletos), **(5)** viés de relatórios (relatórios de resultados seletivos) e outros vieses (o comitê de ética, estatísticas e segurança no local de trabalho). Construímos uma figura no programa Review Manager 5.3, da Colaboração Cochrane (RoB 2.0), para demonstrar o risco de viés em todos os estudos incluídos. Os itens da ferramenta RoB foram pontuados com “sim” (baixo risco de viés); “Não” (alto risco de viés);

ou “pouco claro” (indicando que o item não foi relatado e, portanto, o risco de viés era desconhecido).

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1 Seleção de estudos guiado pelo PRISMA**

Nossa estratégia de busca permitiu a recuperação de 3.067 estudos (MEDLINE: 614; Scopus: 1.069; Web of Science: 1.384). Após a remoção de 676 duplicatas, 2.327 estudos foram excluídos devido ao tema inadequado rastreado pela leitura dos títulos e resumos. Sessenta e quatro estudos foram lidos na íntegra (texto completo) e 44 foram excluídos pelos critérios de elegibilidade. As referências bibliográficas dos 20 artigos selecionados foram analisadas e 2 estudos foram adicionados de acordo com os critérios de inclusão, resultando em 22 estudos [25–46] incluídos nesta revisão sistemática (Figura 1).



**Figura 1:** Diagrama de fluxo dos resultados da pesquisa de literatura de revisão sistemática com base na declaração do PRISMA (Principais itens para relatar revisões sistemáticas e meta-análise) (<http://www.prisma-statement.org/>).

### 3.2 Características das Publicações e Animais Experimentais

As características gerais dos estudos e modelos experimentais selecionados são apresentadas na Tabela S2. Os estudos foram publicados entre 1955 e 2016 e foram realizados em vários países, principalmente Estados Unidos da América (n = 8; 36,36%), seguido pela Alemanha (n = 2; 9,09%) e Inglaterra, Austrália, Coreia, Canadá, Japão, Nova Zelândia, China, Polônia, Nigéria, Irã, Malásia e Índia (n = 1 cada; 4,54%). O rato foi o principal modelo animal utilizado nos estudos (n = 15; 68,18%), seguido dos camundongos (n = 7; 31,81%). Entre as linhagens de ratos, a maioria dos estudos utilizou Sprague-Dawley (n = 7; 31,81%), seguido por Long-Evans (n = 3; 13,63%) e ratos Wistar (n = 3; 13,63%). Ratos albinos (n = 1; 4,54%) e Wistar-Unilever foram usados em apenas 1 estudo (n = 1; 4,54%). Entre os camundongos, houve grande variação entre as linhagens, incluindo Fawn, Wild-type, ArKO, apolipoproteína E-null, ICR, CD-1 e Balb / C (n = 1 cada; 4,54%), e apenas um estudo (n = 1; 4,54%) não identificou a linhagem.

Todos os animais experimentais analisados eram machos com variações no peso e na idade. Todos os estudos com ratos relataram o peso e a idade dos animais, que variaram de 62 a 570g e de 21 a 365 dias, respectivamente. Em camundongos, o peso dos animais variou de 25 a 43g e a idade variou de 21 a 42 dias; apenas um estudo não relatou a idade e outro não relatou o peso.

### 3.3 Características do Desenho Experimental

As características dos modelos experimentais e da dieta utilizada em todos os estudos que avaliaram as isoflavonas na função testicular estão descritas na Tabela S2. A maioria dos estudos (n = 13; 59,09%) usou ração livre de isoflavona, oito estudos (36,36%) usaram dieta padrão e um estudo (4,54%) usou dieta 86. A origem da ração foi citada por dezenove estudos (86,36%), e três estudos (13,63%) não forneceram essa informação.

A descrição das principais características experimentais dos estudos está detalhada na Tabela S3. Estudos têm mostrado variações em relação ao início da exposição experimental à isoflavonas, onde dez estudos (45,45%) iniciaram a exposição durante o desenvolvimento embrionário (gestação), dois estudos (9,09%) iniciaram na fase juvenil (28 a 30 dias), nove estudos (40,90%) iniciaram na fase adulta (42 a 180 dias), e apenas um (4,54%) não mencionou a idade inicial dos animais. A administração oral de isoflavonas foi utilizada pela maioria dos estudos 90,09% (n = 20), dos quais 68,18% (n = 15) com ingestão de alimentos e 22,72% (n = 5) por gavagem. As vias, subcutânea e intraperitoneal, foram utilizadas em apenas 4,54% dos

estudos (n = 1, cada). Todos os estudos tiveram um grupo controle em seus experimentos. O alimento livre de isoflavonas foi usado como controle em nove estudos (40,90%); caseína em três (13,63%); água destilada e azeite em dois (9,09%, cada); e dieta 86, dieta padrão, alimento comercial, óleo de milho, Tween-80 e dimetilsulfóxido em um estudo (4,54%, cada). A maioria das isoflavonas utilizadas foi adquirida em indústrias especializadas (n = 16; 72,72%), três foram extraídas de plantas (16,63%), um estudo utilizou isoflavona sintética (4,54%) e dois estudos (9,09%) não forneceram esta informação. A administração de isoflavonas foi realizada diariamente em todos os experimentos. O período experimental foi relatado entre 5 e 365 dias de exposição em ratos (n = 15; 68,18%) e entre 25 e 180 dias em camundongos (n = 7; 31,81%).

**Tabela S2.** Características dos modelos experimentais e da dieta utilizada em todos os estudos que avaliaram a isoflavona na função testicular.

| Estudos                      | País | Modelo animal | Espécie               | Sexo  | Peso (g) | Idade (dias)  | Estratégia alimentar   | Dieta / Fabricante  |
|------------------------------|------|---------------|-----------------------|-------|----------|---------------|------------------------|---|
| East, 1955 [25]              | ENG  | Camundongos   | Fawn                  | Male  | (?)      | 60            | Alimento s/ isoflavona | Farinha integral 45%, aveia moída 40%, farinha de peixe 8%, fermento seco 1%, leite desnatado seco 3%, óleo de fígado de bacalhau 2% e cloreto de sódio 1%, (?)   |
| Roberts et al., 2000 [26]    | EUA  | Ratos         | Sprague-Dawley        | Macho | 300      | 21 / 70 / 130 | Alimento s/ isoflavona | (?), American Institute of Nutrition (AIN)  |
| Delclos et al., 2001 [27]    | EUA  | Ratos         | Sprague-Dawley        | Macho | 63       | 21 / 50       | Alimento s/ isoflavona | (?), Dieta pellet NIH-31 padrão   |
| Robertson et al., 2002 [28]  | AUS  | Camundongos   | Wild-type and ArKO    | Macho | 25       | 98 / 365      | Alimento s/ isoflavona | (?), Glen Forrest, Austrália Ocidental  |
| Cline et al., 2004 [29]      | EUA  | Camundongos   | Apolipoprotein E-null | Macho | 40       | 42            | Alimento s/ isoflavona | AIN 76A, (?)  |
| Lee et al., 2004 [30]        | KOR  | Camundongos   | ICR                   | Macho | 35       | 35            | Dieta padrão           | (?), Purina Coreia, Seul, Coreia ®  |
| Mcvey et al., 2004 [31]      | CAN  | Ratos         | Sprague-Dawley        | Macho | 99       | 50            | Alimento s/ isoflavona | American Institute of Nutrition (AIN) 96G, (?)  |
| Faqi et al., 2004 [32]       | EUA  | Ratos         | Wistar-Unilever       | Macho | 390      | 42            | Alimento s/ isoflavona | (?), Dieta Teklad 4% Gordura para Ratos / Camundongos   |
| Jaroenporn et al., 2006 [33] | JPN  | Camundongos   | (?)                   | Macho | 42       | 60            | Dieta padrão           | (?), Pokphand, Animal Feed Co., Ltd., Bangkok, Tailândia  |
| Assinder et al., 2007 [34]   | NZL  | Ratos         | Wistar                | Macho | 570      | 90            | Dieta 86               | 78,8% de cereais, 1,5% de leite desnatado, 7% de farinha de peixe, 6% de farinha de ossos, 0,5% de NaCl, 0,1% de pré-mistura para roedores e 1% de farinha de soja, Sharpe, Palmerston North, Nova Zelândia |
| Akingbemi et al., 2007 [35]  | EUA  | Ratos         | Long-Evans            | Macho | 250      | 21            | Alimento s/ isoflavona | (?), Tarlan-Heklad, Indianápolis, IN  |

**Tabela S2 (Continuação).** Características dos modelos experimentais e da dieta utilizada em todos os estudos que avaliaram a isoflavona na função testicular.

| Estudos                        | País | Modelo animal | Espécie        | Sexo  | Peso (g) | Idade (dias) | Estratégia alimentar   | Dieta / Fabricante  |
|--------------------------------|------|---------------|----------------|-------|----------|--------------|------------------------|---|
| Guan et al., 2008 [36]         | CHN  | Ratos         | Sprague-Dawley | Macho | 100      | 21           | Dieta padrão           | Austrália<br>Daidzina (0,0011%), genisteína (0,0616%), genistina (0,0002%) e daidzeína (0,0026%), PicoLab® Rodent Diet 20 |
| Sherrill et al., 2010 [37]     | EUA  | Ratos         | Long-Evans     | Macho | 250      | 21           | Dieta padrão           | (?), Tarlan-Heklad, Indianapolis, IN  |
| Cederroth et al., 2010 [38]    | EUA  | Camundongos   | CD 1           | Macho | 43       | 21           | Alimento s/ isoflavona | (?), Comercial (Harlan Teklad®)   |
| Piotrowska et al., 2011 [39]   | POL  | Ratos         | Wistar         | Macho | 418      | 21           | Dieta padrão           | (?)   |
| Ekaluo et al., 2011 [40]       | NGR  | Ratos         | Albino         | Macho | (?)      | 90           | Dieta padrão           | (?)   |
| Modaresi et al., 2011 [41]     | IRI  | Camundongos   | Balb/C         | Macho | 35       | (?)          | Alimento s/ isoflavona | (?)   |
| Pfahler et al., 2012 [42]      | EUA  | Ratos         | Long-Evans     | Macho | 62       | 21           | Dieta padrão           | (?), Tarlan-Heklad, Indianapolis, IN  |
| Loutchanwoot et al., 2013 [43] | GER  | Ratos         | Sprague-Dawley | Macho | 378      | 60           | Alimento s/ isoflavona | (?), Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Alemanha  |
| Musameh et al., 2014 [44]      | MAS  | Ratos         | Sprague-Dawley | Macho | 208      | 21           | Dieta padrão           | (?), Rain Tree, Austrália   |
| Loutchanwoot et al., 2014 [45] | GER  | Ratos         | Sprague-Dawley | Macho | 378      | 60           | Alimento s/ isoflavona | (?), Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany  |
| Meena et al., 2017 [46]        | IND  | Ratos         | Wistar         | Macho | 281      | 21           | Alimento s/ isoflavona | (?), adquirido das Agências Sai Durga, Bengaluru, Índia   |

ENG- Inglaterra; EUA - Estados Unidos da América; AUS - Austrália; KOR - Coreia; CAN - Canadá; JPN - Japão; NZL - Nova Zelândia; CHN - China; POL - Polónia; NGR - Nigéria; IRI - Irã; GER - Alemanha; MAS - Malásia; IND - Índia.

**Tabela S3.** Descrição das principais características experimentais dos estudos que avaliaram a ação das isoflavonas sobre a função testicular em modelos murinos.

| Estudo                          | Início do tratamento | Via de administração | Tratamento de Controle    | Tratado<br>(Dieta enriquecida com isoflavona)  | Frequência  | Duração (Dias) |
|---------------------------------|----------------------|----------------------|---------------------------|--|-------------|----------------|
| East, 1955<br>[25]              | 60 dias              | Oral<br>(Ingestão)   | Alimento s/<br>isoflavona | Isoflavona sintética<br>Genisteína (isolada): 15 mg/kg   | Diariamente | 25             |
| Roberts et al., 2000<br>[26]    | Gestação             | Oral<br>(Ingestão)   | Alimento s/<br>isoflavona | (?)<br>Genisteína (isolada): 5 mg/kg   | Diariamente | 130            |
| Delclos et al., 2001<br>[27]    | Gestação             | Oral<br>(Ingestão)   | Alimento s/<br>isoflavona | Toronto researc chemicals, Inc. ®<br>Genisteína (isolada): 5, 25, 100, 250, 625 e 1250 mg/L                          | Diariamente | 50             |
| Robertson et al., 2002<br>[28]  | Gestação             | Oral<br>(Ingestão)   | Alimento s/<br>isoflavona | Soja 10%<br>Genisteína/Daidzeína (conjugada): 146 mg/kg  | Diariamente | 65             |
| Cline et al., 2004<br>[29]      | 30 dias              | Oral<br>(Ingestão)   | Alimento s/<br>isoflavona | DuPont Protein Technologies®<br>Genisteína/Daidzeína (conjugada): 202.8 mg/kg  | Diariamente | 112            |
| Lee et al., 2004<br>[30]        | 180 dias             | Oral<br>(Gavagem)    | Óleo de<br>milho          | Sigma Chemical®<br>Genisteína (isolada): 2.5 mg/kg   | Diariamente | 35             |
| Mcvey et al., 2004<br>[31]      | 50 dias              | Oral<br>(Ingestão)   | Alimento s/<br>isoflavona | Sigma Chemical®<br>Genisteína/Daidzeína/Gliciteína (conjugada): 31.07, 36.10, 74.50,<br>235.80 e 1.046,60 mg/kg      | Diariamente | 360            |
| Faqi et al., 2004<br>[32]       | 42 dias              | Oral<br>(Ingestão)   | Alimento s/<br>isoflavona | PTI G-2535® National Cancer Institute<br>Genisteína/Daidzein/gliciteina (conjugada): 200 e 2000 mg/kg                | Diariamente | 365            |
| Jaroenporn et al., 2006<br>[33] | 56 dias              | Oral<br>(Ingestão)   | Água<br>destilada         | Isolated plant (Pueraria mirifica), northern Thailand<br>Genisteína/Daidzeína/Gliciteína (conjugada): 10 e 100 mg/kg | Diariamente | 56             |
| Assinder et al., 2007<br>[34]   | 90 dias              | Oral<br>(Ingestão)   | Dieta 86                  | Diet RMH 3500 - Reliance Stockfoods®<br>Genisteína/Daidzeína/Gliciteína (conjugada): 0.465 mg/kg                     | Diariamente | 24             |
| Akingbemi et al., 2007<br>[35]  | Gestação             | Oral<br>(Ingestão)   | Casein                    | Tarlan-Heklad ®, Indianapolis, IN<br>Genisteína/Daidzeína/Gliciteína (conjugada): 5, 50, 500 e 1000 mg/L             | Diariamente | 21             |

**Tabela S3 (Continuação).** Descrição das principais características experimentais dos estudos que avaliaram a ação das isoflavonas sobre a função testicular em modelos murinos.

| Estudo                            | Início do tratamento | Via de administração | Tratamento de Controle    | Tratado<br>(Dieta enriquecida com isoflavona)  | Frequência  | Duração (Dias) |
|-----------------------------------|----------------------|----------------------|---------------------------|--|-------------|----------------|
| Guan et al., 2008<br>[36]         | 28 dias              | Oral<br>(Gavagem)    | Água destilada            | Zhejiang Xinxin Bio-Tech®<br>Genisteína/Daidzeína (conjugada): 30, 150, 300 e 600 mg/kg                    | Diariamente | 84             |
| Sherrill et al., 2010<br>[37]     | Gestação             | Oral<br>(Ingestão)   | Caseína                   | Isolado da planta (Soja) - Harlan-Teklad®<br>Genisteína/Daidzeína/Gliciteína (conjugada): 5, 50, 1000 mg/L | Diariamente | 90             |
| Cederroth et al., 2010<br>[38]    | Gestação             | Oral<br>(Ingestão)   | Alimento s/<br>isoflavona | (?)<br>Genisteína/Daidzeína (conjugada): 150 e 190 mg/L  | Diariamente | 180            |
| Piotrowska et al., 2011<br>[39]   | Gestação             | Oral<br>(Ingestão)   | Dieta padrão              | Meno Stop®<br>Genisteína/Daidzeína (conjugada): 200 mg/kg  | Diariamente | 90             |
| Ekaluo et al., 2011<br>[40]       | 90 dias              | Oral<br>(Ingestão)   | Dieta comercial           | Livestock Fram® (Grãos de Soja)<br>Genisteína/Daidzeína (conjugada): 100, 200 e 300 mg/kg                  | Diariamente | 60             |
| Modaresi et al., 2011<br>[41]     | (?)                  | Oral<br>(Ingestão)   | Alimento s/<br>isoflavona | Isolado de planta (Soja)<br>Genisteína/Daidzeína (conjugada): 20, 30, 50% na comida                        | Diariamente | 63             |
| Pfaehler et al., 2012<br>[42]     | Gestação             | Oral<br>(Ingestão)   | Caseína                   | Isolado de planta (Soja) - Harlan-Teklad®<br>Genisteína/Daidzeína (conjugada): 0.1, 5, 50, 1000 mg/L       | Diariamente | 90             |
| Loutchanwoot et al., 2013<br>[43] | 90 dias              | Oral<br>(Gavagem)    | Azeite                    | Changzhou Dahua Imp. and Exp. ®<br>Equol (isolada): 100 e 250 mg/kg  | Diariamente | 5              |
| Musameh et al., 2014<br>[44]      | Gestação             | Subcutânea           | Tween-80                  | Indofine Chemical Com. ®<br>Genisteína (isolada): 1, 10 e 100 mg/kg  | Diariamente | 21             |
| Loutchanwoot et al., 2014<br>[45] | 120 dias             | Oral<br>(Gavagem)    | Azeite                    | Changzhou Dhua Imp. and Exp. ®<br>Equol (isolada): 100 e 250 mg/kg   | Diariamente | 5              |
| Meena et al., 2017<br>[46]        | Gestação             | Intraperitoneal      | Dimetilsulfóxido          | Chengdu Biopurify Phytochemicals®<br>Genisteína (isolada): 2, 20 and 100 mg/kg                             | Diariamente | 100            |

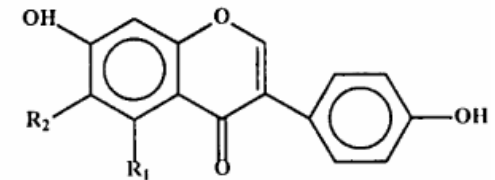
### 3.4 Características das Isoflavonas

O percentual das principais formas de administração das isoflavonas e suas alterações fisiológicas em modelos murinos são apresentadas na Figura 2. Quatro tipos de isoflavonas (genisteína, daidzeína, gliciteína e equol) foram utilizados nos estudos selecionados. As isoflavonas foram administradas tanto na forma isolada quanto na forma conjugada. As isoflavonas agliconas foram utilizadas em mais da metade dos estudos (54,54%) e as glicosiladas em 45,45% dos estudos (Figuras 2 (a) –2 (c)). As isoflavonas agliconas isoladas administradas foram a genisteína (n = 6; 27,27%) e o equol (n = 2; 9,09%), e as agliconas conjugadas administradas foram a genisteína/daidzeína (n = 3; 13,64%) e genisteína/daidzeína/gliciteína (n = 2; 9,09%). Todas as isoflavonas glicosiladas foram administradas conjugadas, sendo genisteína/daidzeína (n = 6; 27,27%) e genisteína/daidzeína/gliciteína (n = 3; 18,18%) as mais utilizadas. As isoflavonas conjugadas foram administradas por 63,63% (n = 14) dos estudos e as isoladas por 36,36% (n = 10) dos estudos (Figura 2 (d)). A forma de ação das isoflavonas nos componentes celulares (citoplasma e núcleo) ocorreram em onze estudos (50%) (Figura 2 (e)), sendo que quatro estudos (18,18%) relataram alterações citoplasmáticas e sete estudos (31,81%) alterações nucleares. Em relação à função molecular, os processos biológicos de ação das isoflavonas foram relatados por quatro estudos (18,18%) (Figura 2 (f)), e em 9,09% (n = 2; cada) dos estudos os efeitos das isoflavonas na proliferação das células de Leydig e regulação hormonal foram observados.

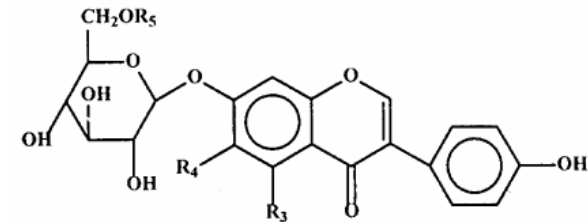
(a)

| <b>Agliconas (54.54%)</b>                   | <b>Glicosiladas (45.45%)</b>             |
|---|--|
| Genisteína (27.27%)                         | Genisteína/Daidzeína (27.27%)            |
| Genisteína/Daidzeína (9.09%)                | Genisteína/Daidzeína/Gliciteína (18.18%) |
| Genisteína/<br>Daidzeína/Gliciteína (9.09%) | -  |

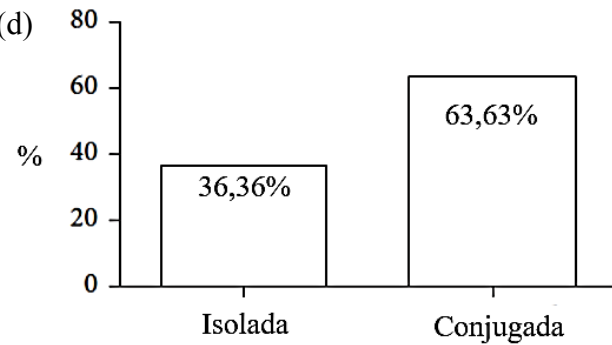
(b)



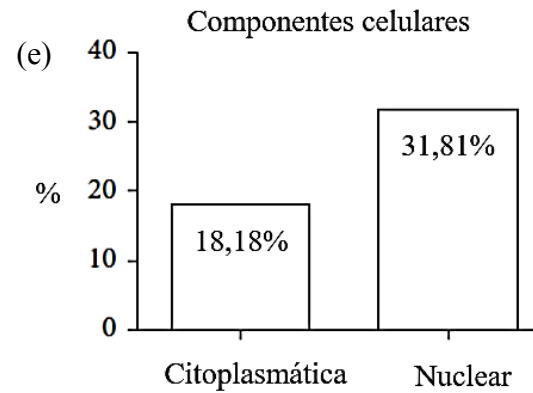
(c)



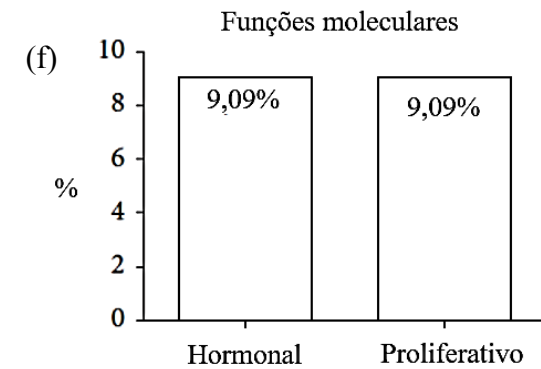
(d)



(e)



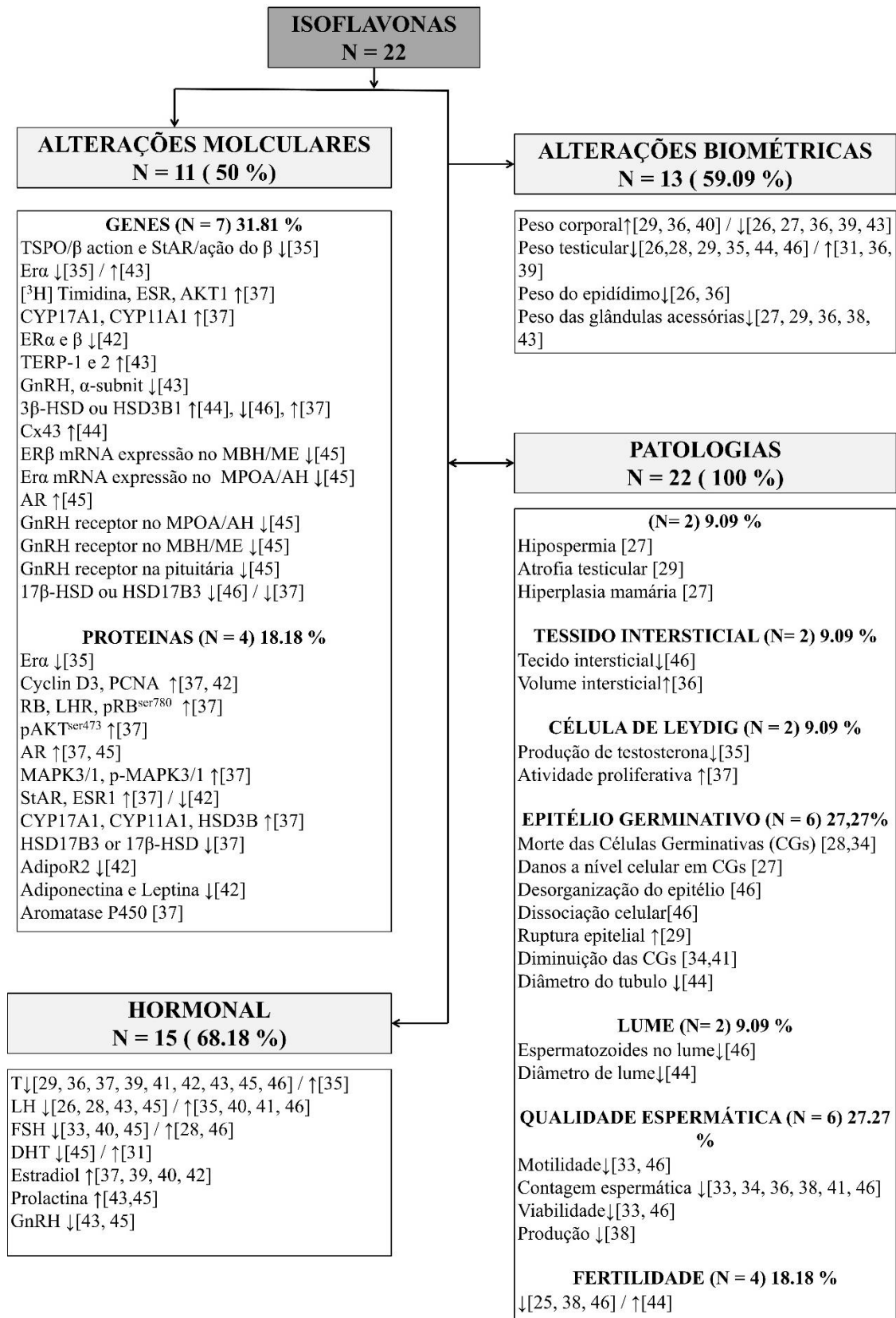
(f)



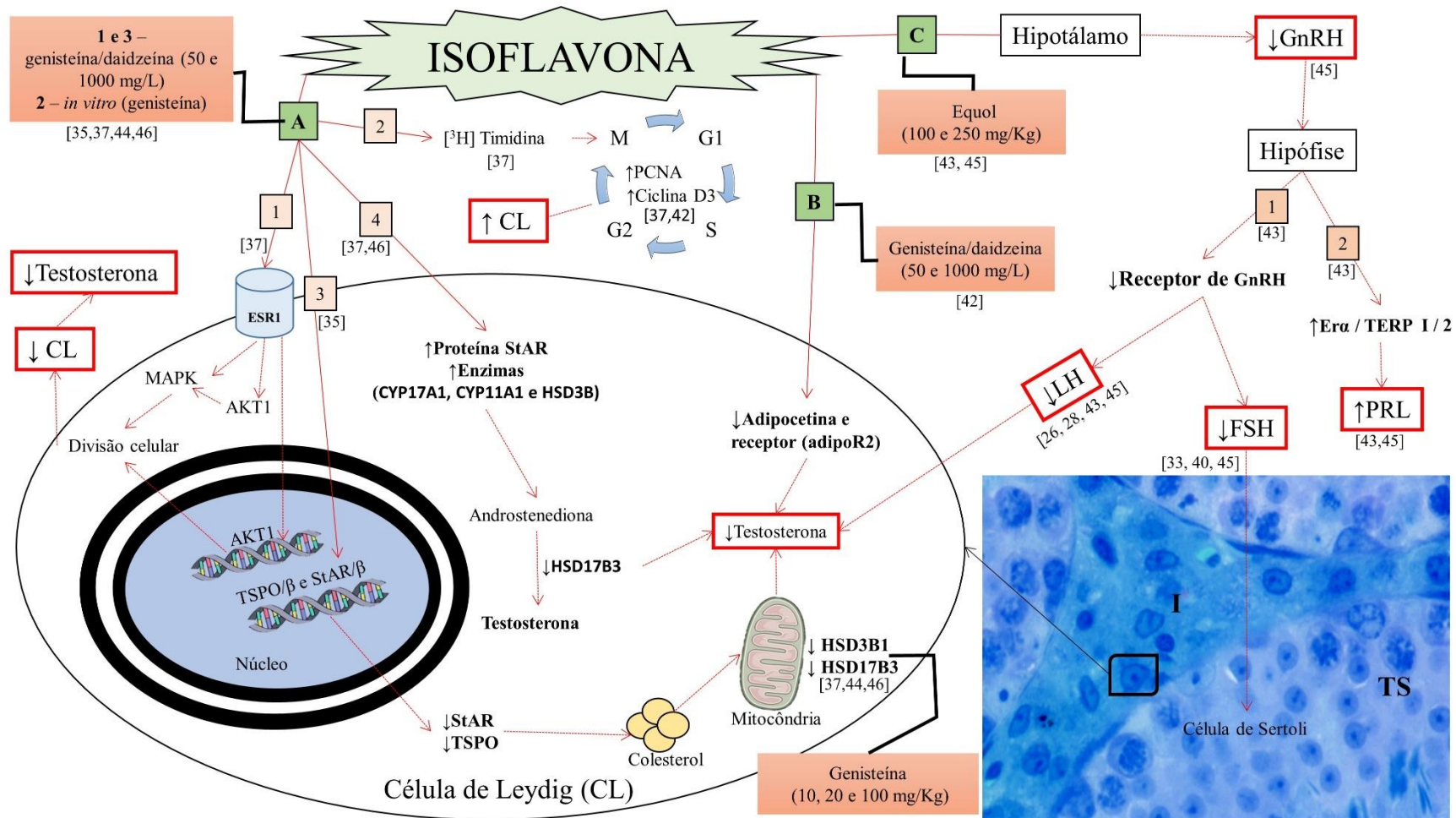
**Figura 2.** Principais formas de administração das isoflavonas e suas alterações fisiológicas em modelos murinos: (a) porcentagem de isoflavonas utilizadas; (b) forma química da isoflavona aglicona; (c) forma química da isoflavona glicosilada; (d) porcentagem das isoflavonas administradas, isoladas e conjugadas; (e, f) principais processos biológicos que levaram a mudanças fisiológicas.

### **3.5 Principais resultados**

Os resultados gerais e a porcentagem de alterações moleculares, hormonais, biométricas e patológicas encontradas pelos estudos incluídos, mostrando os efeitos das isoflavonas na função testicular em modelos murinos, são mostrados na Figura 3. Alterações moleculares foram observadas em 50% (n = 11) dos estudos cuja interferência na atividade gênica foi encontrada em sete estudos (31,81%) e alterações na síntese e atividade proteica foram relatados em quatro estudos (18,18%). Alterações hormonais foram observadas em 68,18% dos estudos (n = 15) e alterações biométricas em 59,09% dos estudos (n = 13). Alterações patológicas foram encontradas em todos os estudos selecionados nesta revisão. As alterações nos processos biológicos encontradas na estrutura testicular após a exposição às isoflavonas foram descritas em detalhes na Figura 4, mostrando maiores evidências de alterações nas funções moleculares e nos componentes celulares.



**Figura 3.** Resultados gerais dos estudos incluídos mostrando a ação das isoflavonas na função testicular em modelos murinos. ↑ = aumento; ↓ = diminuição.



**Figura 4.** Principais processos biológicos que induzem alterações testiculares após exposição a isoflavonas em modelos murinos. Funções moleculares envolvendo o núcleo das células de Leydig e componentes citoplasmáticos (a, b). Funções moleculares envolvendo alterações no eixo Hipotálamo-Hipófise-Gônada (HHG) (c). I: Intertúbulo; TS: Túbulo Seminífero.

### 3.5.1 Processos Biológicos

A exposição de ratos machos a isoflavonas aumentou os níveis de receptor de estrogênio  $\alpha$  (ESR1), proteína quinase ativada por mitogênio 3/1 (MAPK 3/1), proteína quinase B (AKT1), pAKTSer473 e [3H] Timidina em célula de Leydig (n = 1; 4,54%). O mesmo estudo também observou aumento na ciclina D3, da proteína antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) (n = 2, 9,09%) e diminuição da expressão da proteína translocadora /  $\beta$  (TSPO/ $\beta$ ) e proteína reguladora aguda esteroidogênica /  $\beta$  (StAR/ $\beta$ ) *in vitro* (Figura 3). Alterações testiculares devido à ação das isoflavonas por funções moleculares, envolvendo o processo biológico de regulação da via de sinalização do receptor de estrogênio intracelular (GO: 0033146) e proliferação celular (GO: 0042127), foram encontradas em três (13,63%) estudos e são mostrados na Figura 4 (a). As isoflavonas (genisteína/daidzeína/gliciteína) podem se ligar ao receptor de estrogênio  $\alpha$  (ESR1) e atuar através dos elementos de resposta do estrogênio no núcleo das células de Leydig para regular e diminuir a expressão gênica e/ou induzir interações proteína-proteína nas vias de sinalização. As proteínas nas vias de sinalização são mediadas pela proteína quinase B (AKT1) e proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK), que influenciam a ativação da quinase e atuam na progressão do ciclo celular. A modulação da atividade proliferativa provoca diminuição do número de células de Leydig (CL) (célula produtora de testosterona) e, conseqüentemente, dos níveis de testosterona intratesticular e sérica (Figura 4 (a), -1). Curiosamente, a exposição *in vitro* à genisteína, no período perinatal, aumenta a captação de [3H] Timidina levando ao aumento na proporção de proliferação da proteína PCNA e da proteína ciclina D3 com consequência do aumento na proliferação das CL (Figura 4, 2). O estudo *in vitro* foi realizado em trabalhos que utilizaram análises *in vivo*, como forma de confirmação dos resultados, por isso está sendo relatado. Além disso, os mesmos estudos observaram aumento da expressão de proteínas para o receptor LH (LHR) e ESR1 na CL e receptor androgênico (AR) (5 mg / L) (Figura 3). Esses resultados confirmam a capacidade mitogênica da genisteína da CL.

Alterações de proteínas envolvidas no transporte de colesterol para a mitocôndria e, conseqüentemente, síntese de testosterona foram relatadas por quatro (18,18%) estudos (Figura 3). As isoflavonas genisteína/daidzeína/gliciteína (50 e 1000 mg/L), administrada em ratas grávidas apenas durante o dia gestacional (GD) 12 e ao dia pós-natal (PND) 21, induziu redução na expressão da proteína reguladora aguda esteroidogênica (StAR) e na TSPO. As proteínas transcritas por StAR e TSPO, que sofreram diminuição, atuam diretamente no transporte do colesterol para a mitocôndria. A diminuição das proteínas portadoras de colesterol na

mitocôndria induz redução na produção de testosterona (Figura 4 (a), 3) e mudanças no fenótipo que torna possível a espermatogênese (MP: 0001155).

A expressão de 3-beta-hidroxiesteróide desidrogenase (HSD3B1) e 17-beta-hidroxiesteróide desidrogenase (HSD17B3) está envolvida no processo biossintético de androgênio (GO: 0006702) (Figuras 4 (a), 3 e 4). A expressão de HSD3B1, que produz androstenediona na mitocôndria, foi mais intensa nos testículos tratados com genisteína (10 e 100 mg/kg) na fase juvenil (n = 1; 4,54%) do que em ratos tratados na idade adulta (n = 1; 4,54%) (Figura 4 (a), 3). Por outro lado, os níveis de HSD17B3, que expressam enzimas que convertem androstenediona em testosterona na mitocôndria, diminuíram quando expostos a genisteína/daidzeína/gliciteína (50 e 1000 mg/L) (n = 1; 4,54%) e genisteína (20 e 100 mg/kg) (n = 1; 4,54%) (Figura 4 (a), 3). As principais consequências desse processo são alterações no equilíbrio da síntese esteroidogênica. A expressão de StAR e outras proteínas com funções enzimáticas, como citocromo P45017 $\alpha$ -hidroxilase / 17–20 liase (CYP17A1) e citocromo P450 (CYP11A1), que estão envolvidas no processo biológico de síntese de esteroide (GO:0006694), teve alterações em quatro (18,18%) estudos após exposição à isoflavonas (Figura 3). A expressão de StAR e outras proteínas com funções enzimáticas (CYP17A1, CYP11A1 e HSD3B1) aumentou após a exposição a genisteína/daidzeína (50 e 1000 mg/L) (n = 1; 4,54%) (Fig.4 (a), 4). As isoflavonas induzem aumento nas proteínas e enzimas que desempenham papel importante na produção de androstenediona e diminuição na enzima HSD17B3 que atua como cofator na conversão da androstenediona em testosterona, levando a diminuição desse hormônio (Figura 4 (a), 4). Essas mudanças levam à diminuição da produção de testosterona pelas CL.

A diminuição da expressão gênica dos receptores alfa de estrogênio (Er $\alpha$ ) foi relatada em um estudo (4,54%), onde os animais foram expostos a genisteína e daidzeína (5 e 1000 mg/L), enquanto um aumento foi relatado em animais expostos ao equol (250 mg/kg) indicando competição endógena (Figura 3). Observamos aumento da expressão do gene da conexina 43 (Cx43) nas células de Leydig de animais tratados com genisteína (10 e 100 mg/kg) em um estudo (4,54%) (Figura 3). A proteína expressa pelo gene Cx43 atua na comunicação célula-célula, permitindo que ela receba sinais de moléculas importantes para o seu desenvolvimento normal.

A rota pela qual as isoflavonas promovem alterações que levam ao desequilíbrio endócrino no corpo é mostrada na Figura 4 (b). As isoflavonas podem causar redução da proteína adiponectina e do receptor AdipoR2 e, conseqüentemente, diminuir a produção de

testosterona. A proteína adiponectina e o gene AdipoR2 podem alterar a função do receptor de hormônio-proteína (GO: 0016500). A exposição de ratos machos à genisteína/daidzeína (1000 mg/L) no período perinatal induziu diminuição da adiponectina e da proteína AdipoR2 (n = 1; 4,54%), afetando a função endócrina das células de Leydig (Figura 3). No mesmo estudo, os animais foram avaliados até a idade adulta, sendo observada redução da concentração de testosterona, demonstrando a importância das proteínas adiponectina e AdipoR2.

Alterações testiculares devido à ação das isoflavonas sobre as funções moleculares do eixo hipotálamo-hipófise-gônada (HHG), que regula a produção de hormônios importantes para a espermatogênese, foram relatadas por dois (9,09%) estudos e são mostradas na Figura 4 (c). O hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) tem a função molecular (GO:0005179). Animais tratados com equol (250 mg/kg) apresentaram diminuição da produção de GnRH no hipotálamo e diminuição dos receptores de GnRH na hipófise, levando à diminuição da produção de LH e conseqüentemente da testosterona (Figura 4 (c), 1). O FSH diminuiu (n = 3; 13,63%) (Figura 3), levando à diminuição da função das células de Sertoli. Após a exposição ao equol (100 e 250 mg/kg), também houve redução no GnRH que levou ao aumento na expressão dos genes *Era* e do receptor de estrogênio truncado product-1 / -2 (TERP-1/2) (Figura 3), induzindo aumento na produção de prolactina (Figura 4 (c), 2).

O equol na dose de 250 mg/kg também causou redução na expressão do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) de genes responsáveis por induzir a produção de andrógenos, importantes para a função testicular em áreas específicas do cérebro (n = 1, 4,54%) (Figura 3). Doses de 100 e 250 mg/kg reduziram os níveis de GnRH e mRNA na área pré-óptica medial / hipotálamo anterior (MPOA/AH), e a dose de 100 mg/kg reduziu os níveis de expressão de *Era* mRNA (Figura 3). A dose de equol (250 mg/kg) reduziu os níveis de transcritos de mRNA de *ERβ* no hipotálamo basal medial / eminência mediana (MBH/ME) (Figura 3). Essas mudanças levam ao comportamento de acasalamento alterado e à diminuição do GnRH, que é importante para a produção de LH e FSH.

A ação das isoflavonas como desreguladores endócrinos foi observada na maioria dos estudos (n = 15; 68,18%) (Figura 3). A testosterona diminuiu em nove estudos após a exposição a todos os tipos de isoflavonas testadas (40,90%). O aumento dos níveis de testosterona foi relatado apenas em um estudo (4,54%), onde os animais foram tratados com genisteína/daidzeína/gliciteína (glicosilada). Os níveis de LH (hormônio importante para o funcionamento das células de Leydig), diminuiu apenas em quatro estudos (18,18%) com isoflavonas agliconas (equol e genisteína) e glicosiladas (genisteína/daidzeína/gliciteína). O

aumento do LH foi observado em quatro estudos (18,18%) com isoflavonas agliconas (genisteína) e glicosiladas (genisteína/daidzeína/gliciteína e genisteína/daidzeína). Os níveis de FSH (hormônio importante para o funcionamento das células de Sertoli) diminuiu em três estudos (13,63%) com isoflavonas agliconas (equol) e glicosiladas (genisteína/daidzeína/gliciteína e genisteína/daidzeína). O aumento do FSH foi relatado em apenas dois estudos (9,09%) com isoflavonas agliconas (genisteína) e glicosiladas (genisteína/daidzeína). A diidrotestosterona (DHT), um metabólito secundário da testosterona, diminuiu em apenas um estudo (4,54%) com equol e aumentou em outro estudo (4,54%) com isoflavonas agliconas (genisteína/daidzeína/gliciteína). O estradiol aumentou em quatro estudos (18,18%) com isoflavonas agliconas (genisteína/daidzeína) e glicosiladas (genisteína/daidzeína/gliciteína e genisteína/daidzeína). A prolactina aumentou em dois (9,09%) estudos, e o GnRH, hormônio importante para a produção de LH e FSH, diminuiu em dois (9,09%) estudos, onde todos os animais foram tratados com equol.

Em relação à biometria corporal, apenas oito estudos (36,36%) relataram esses valores após o tratamento. Cinco estudos (22,73%) encontraram diminuição significativa no peso corporal dos animais tratados em relação ao grupo controle, e três estudos (13,64%) encontraram aumento significativo neste parâmetro. O peso testicular foi relatado em nove estudos (40,90%), diminuindo em seis (27,27%) e aumentando em três (13,63%) deles. O peso das glândulas acessórias também foi relatado, com redução após o tratamento em cinco estudos (22,73%), e o peso do epidídimo reduzido em dois estudos (9,09%).

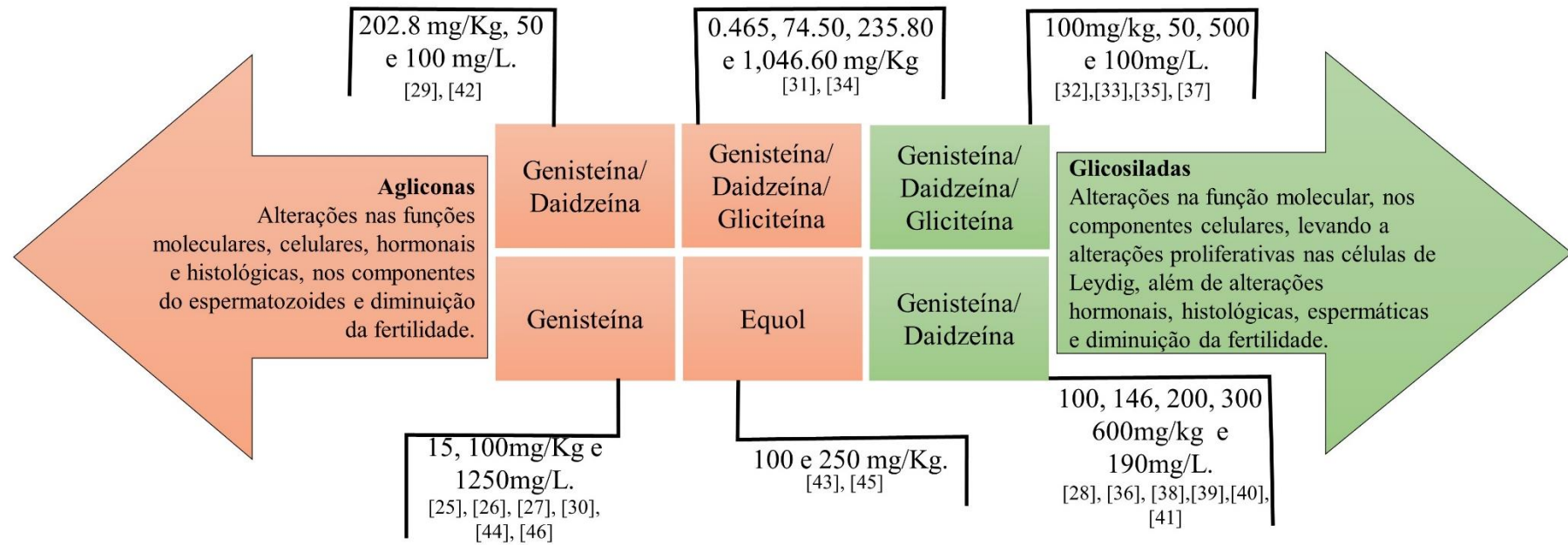
Todos os estudos selecionados nesta revisão encontraram patologias após exposição às isoflavonas (Figura 3). As principais consequências para o tecido testicular podem ter ocorrido devido a alterações na função molecular e nos componentes celulares. As alterações encontradas no epitélio germinativo (n = 6; 27,27%) foram morte, diminuição e dano ao nível das células germinativas, além de desorganização, dissociação celular e aumento do distúrbio epitelial. Dois estudos (9,09%) encontraram alterações no tecido intersticial, como diminuição do tecido (n = 1) e aumento do volume (n = 1). Também foi encontrada diminuição do número de espermatozoides no lume (n = 1; 4,54%) e aumento do diâmetro luminal (n = 1; 4,54%). Mudanças na qualidade do espermatozoide (n = 6; 27,27%), como diminuição da contagem (n = 6), motilidade (n = 2) e viabilidade (n = 2) também foram observadas. Em 9,09% (n = 2) dos estudos, foi relatada diminuição na produção de testosterona pelas células de Leydig. Dois estudos (9,09%) observaram patologias como hipospermia, atrofia testicular e hiperplasia

mamária. A análise da fertilidade foi realizada em quatro estudos (18,18%), diminuindo em três estudos (13,63%) e aumentando em apenas um (4,54%).

### *3.5.2. Relação entre classes e doses de isoflavonas*

A Figura 5 mostra a representação das diferentes doses de isoflavonas e suas consequentes alterações nas funções testiculares. As principais alterações encontradas na estrutura testicular após a exposição à isoflavona aglicona foram nas funções moleculares e nos componentes celulares que levaram a danos histológicos, alterações espermáticas e diminuição da fertilidade. Os animais que receberam genisteína nas doses de 15 e 100 mg/kg e 1250 mg/L apresentaram alterações nos componentes celulares e alterações histológicas, levando a patologias, além de alterações espermáticas e redução da fertilidade. Os animais tratados com equol nas doses de 100 e 250 mg/kg apresentaram alterações nos componentes celulares e alterações hormonais. A genisteína/daidzeína (aglicona conjugada) nas doses de 202,8 mg/kg e 50 e 100 mg/L induziu alterações nos componentes celulares, além de patologias no testículo. Animais tratados com genisteína/daidzeína/gliciteína nas doses de 0,465, 74,50, 235,80 e 1.046,60 mg/kg apresentaram alterações hormonais, histológicas e espermáticas.

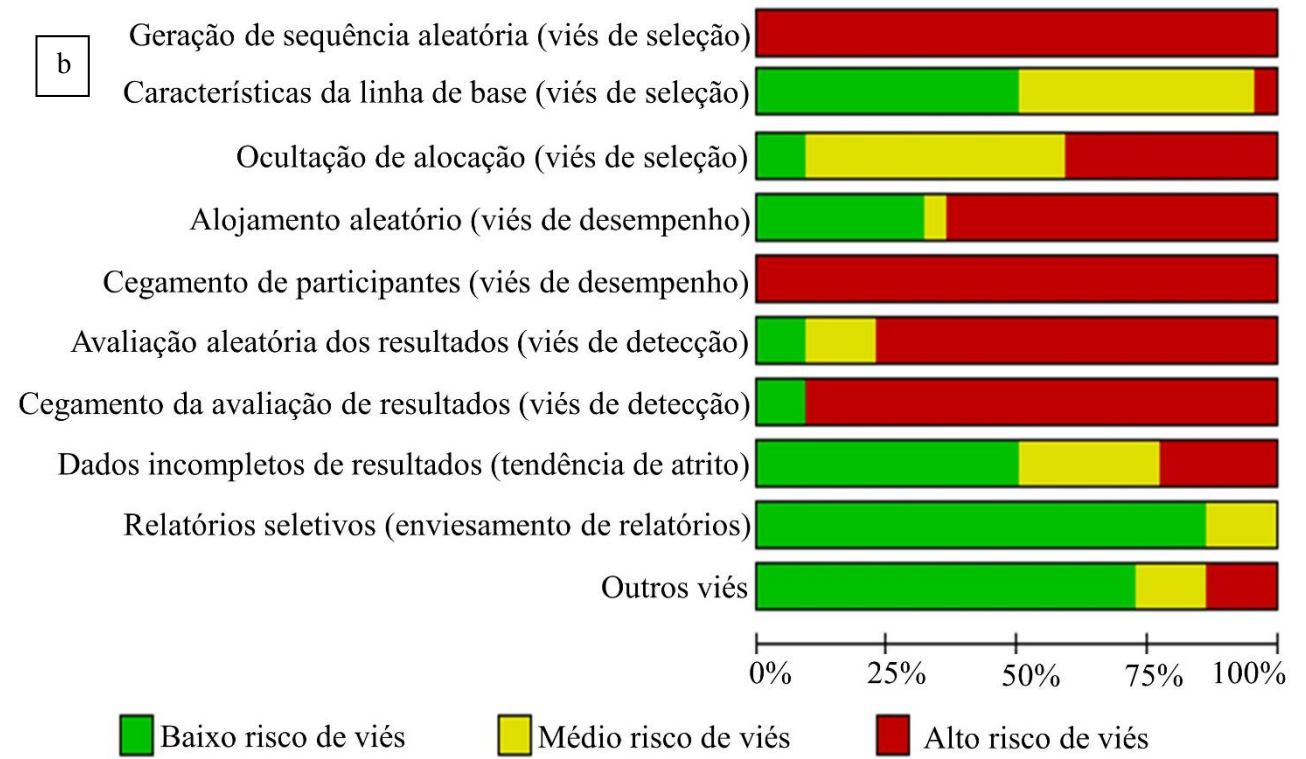
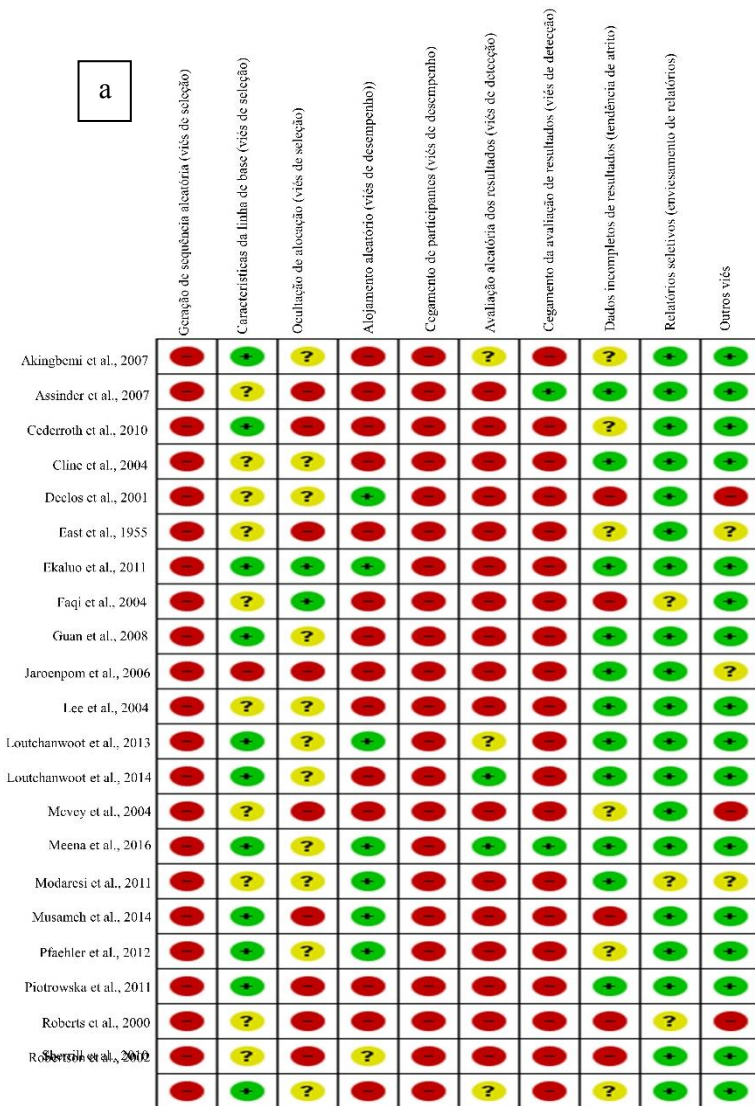
As principais alterações induzidas pelas isoflavonas glicosiladas foram nas funções moleculares, em componentes celulares, hormonais e danos histológicos, além de mudanças espermáticas e redução da fertilidade. Os animais que receberam genisteína/daidzeína nas doses de 100, 146, 200, 300 e 600 mg/kg e 190 mg/L apresentaram alterações hormonais, histológicas e diminuição da fertilidade. As isoflavonas genisteína/daidzeína/gliciteína nas doses de 100 mg/kg, 50, 500 e 100 mg/L induziram alterações nas funções moleculares e nos componentes celulares, além de alterações hormonais, histológicas e espermáticas. Grandes variações foram encontradas nas dosagens testadas e todas apresentaram alterações testiculares. As dosagens das isoflavonas agliconas variaram de 0,465 a 1.046,60 mg/kg e 190 a 1250 mg/L. As dosagens das isoflavonas glicosiladas variaram de 100 a 600 mg/Kg e 100 a 1000 mg/L.



**Figura 5.** Representação de diferentes doses de isoflavonas e suas implicações nas alterações testiculares.

### 3.6 Risco do viés

A avaliação da qualidade dos estudos em nível individual é mostrada na Figura 6 (a), e a avaliação do risco de viés dos estudos incluídos nesta revisão sistemática é mostrado na Figura 6 (b). Nenhum dos estudos atendeu a todos os critérios metodológicos analisados. Vinte e um estudos (95,45%) descreveram as características basais (linhagem, peso e idade) entre os animais, entretanto, oito estudos ( $n = 8$ ; 36,36%) não apresentaram todas as características basais necessárias. Apenas um estudo (4,54%) não mencionou se os grupos experimentais eram semelhantes nas características basais. Nove estudos (40,90%) não mencionaram sigilo de alocação. Três estudos (13,64%) relataram alojamento aleatório de animais e descreveram os métodos usados. Cinco estudos (22,73%) relataram apenas que foram randomizados e quatorze estudos (63,63%) não forneceram essa informação. Apenas oito estudos (36,36%) relataram que os animais foram expostos a condições ambientais padrão e quatorze estudos (64,63%) não forneceram essa informação. Nenhum dos estudos relatou cegamento (que não tem informações da condução do experimento) dos participantes. A seleção aleatória para avaliação de resultados foi aplicada em seis estudos (27,27%), e dois estudos (9,09%) relataram que a avaliação dos resultados foi cegado (sem informações do que estava sendo avaliado). Em relação aos dados de resultados incompletos, sete estudos (31,81%) não relataram se os animais foram excluídos ou o motivo da exclusão, sete estudos (31,81%) não relataram claramente essas informações e apenas oito estudos (36,36%) mencionaram todas as informações de exclusão necessárias. Todos os estudos seguiram a metodologia e apresentaram os resultados propostos. A maioria dos estudos ( $n = 20$ ; 90,09%) estavam aparentemente livres de outros problemas que poderiam resultar em alto risco de viés. Por outro lado, dois estudos (9,09%) apresentaram risco devido à omissão do comitê de ética em estudos com animais e à falta de informações sobre as estatísticas utilizadas.



**Figura 6.** Resultados do risco de viés e indicadores de qualidade metodológica em nível individual (a) e todos os estudos incluídos nesta revisão sistemática (b) que avaliaram o efeito da isoflavona na estrutura testicular. Os itens no Centro de Revisão Sistemática para Experimentação com Animais de Laboratório (SYRCLE) risco de avaliação de viés foram pontuados com “sim” indicando baixo risco de viés, “não” indicando alto risco de viés ou “pouco claro” indicando que o item não foi relatado, resultando em um risco desconhecido de viés.

## 4. DISCUSSÕES

Neste estudo, realizamos uma revisão sistemática para investigar a ação das isoflavonas nos testículos de modelos murinos. Nossos resultados mostraram que as isoflavonas agliconas e glicosiladas são prejudiciais aos testículos, sendo que as glicosiladas nas doses de 50, 100, 146, 200, 300, 500 e 600 mg / kg, bem como 190 e 1000 mg / L, foram mais prejudiciais. Vários processos biológicos podem ser alterados após a exposição à isoflavonas, e esses processos têm sido relatados na literatura. O principal alvo das isoflavonas são as células de Leydig, pois a diminuição da produção de testosterona foi relatada com maior frequência. Além disso, a via de administração das isoflavonas mais utilizada foi a oral, demonstrando a preocupação dos autores em simular a forma mais comum de exposição humana.

Em relação à classificação química das isoflavonas, as agliconas foram as mais utilizadas. No entanto, a administração das isoflavonas agliconas e glicosiladas conjugadas foi utilizada pela maioria dos estudos. As isoflavonas agliconas são facilmente absorvidas pelo corpo, enquanto as glicosiladas (conjugadas) sofrem hidrólise prévia, onde são convertidos em agliconas pela  $\beta$ -glicosidases do intestino delgado (médio – jejuno e íleo) antes da absorção [47, 48]. A administração de isoflavonas conjugadas pode comprometer os achados de estudos individuais, uma vez que é impossível atribuir seu efeito a um tipo particular de isoflavona quando a administração é na forma conjugada. Por outro lado, os compostos isolados fornecem resultados menos genéricos que permitem um melhor entendimento dos mecanismos de ação de uma determinada isoflavona. Dentre os estudos avaliados, a genisteína e a daidzeína foram as mais utilizadas, administradas separadamente e em combinação devido à presença predominante desses compostos na soja, leguminosa presente em grandes proporções na dieta humana [2].

Nossos resultados deixam claro que há preocupação com o consumo de isoflavonas e saúde reprodutiva desde 1955, porque estes compostos podem atuar como xenoestrogênios [49, 50]. Alguns estudos indicam que o consumo de isoflavonas pode causar alterações androgênicas, e outros relatam que essas alterações podem ser insuficientes para comprometer a função testicular. No entanto, sabe-se que mudanças no controle androgênico testicular prejudica diretamente a espermatogênese [51, 52]. Existem relatos na literatura indicando que as isoflavonas inibem a biossíntese de andrógenos quando tomadas em doses mais altas [53] ou causam aumento nos níveis da testosterona sérica, quando tomadas em concentrações mais baixas [54, 55]. As maiores alterações encontradas nos estudos incluídos foram em animais que receberam isoflavonas nas doses de 50, 100, 146, 200, 300, 500 e 600 mg/kg e 190 e 1000

mg/L, com período de exposição variando do gestacional até a idade adulta. Observamos que a ingestão de isoflavonas em doses variadas pode interagir negativamente com o equilíbrio androgênico testicular.

A produção de testosterona diminuiu significativamente devido à ação das isoflavonas no eixo HHG. As células de Leydig (CL) são abundantes nos testículos, com a função de produzir testosterona, um hormônio essencial para o funcionamento da espermatogênese e expressão das características sexuais secundárias masculinas [11]. As isoflavonas (genisteína/daidzeína/gliciteína) podem se ligar à ESR1 e regular a ação hormonal no núcleo da CL. As proteínas nas vias de sinalização são mediadas pela proteína quinase B (AKT1) e proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK) que influenciam a ativação da quinase e atuam na progressão do ciclo celular. As isoflavonas podem regular a expressão gênica e/ou induzir interações proteína-proteína, aumentando a fosforilação de MAPK em MAPK3 / 1 (p-MAPK3 / 1 ou p-p42 / 44) e diminuindo a progressão do ciclo celular. A modulação da ação hormonal e da atividade proliferativa causam diminuição da função e do número de CL, com consequente redução dos níveis testiculares e séricos de testosterona. A espermatogênese requer altas concentrações de testosterona [11, 52], e baixos níveis desse hormônio podem indicar redução na função testicular. A exposição *in vitro* à genisteína, no período perinatal, aumenta a captação de [3H] Timidina levando ao aumento na proporção da proteína PCNA e da ciclina D3, com consequente aumento proliferativo das CL. As proteínas PCNA e ciclina D3 são importantes na ativação do ciclo celular [56, 57]. Além disso, observa-se o aumento na expressão de proteínas para o receptor de LH (LHR), ESR1 e do receptor androgênico (AR) nas CL (5 mg / L de genisteína). Os resultados encontrados nos estudos avaliados nessa revisão confirmam a capacidade mitogênica da genisteína nas CL. A capacidade mitogênica da genisteína pode ser para compensar a diminuição da testosterona. Além disso, a exposição de ratos às isoflavonas pode afetar a diferenciação das CL induzindo potenciais alterações na função testicular.

A redução da testosterona também pode ser justificada pela diminuição da expressão de TSPO e StAR mitocondrial após exposição a isoflavonas glicosiladas (genisteína/daidzeína/gliciteína). Os genes TSPO e StAR estão diretamente associados ao transporte e movimento do colesterol através das membranas mitocondriais da CL [58]. A diminuição das proteínas expressas por esses genes reduz o transporte do colesterol para as mitocôndrias das CL, levando à diminuição da produção de testosterona. Porém, a inibição do gene StAR também foi observada na presença de grandes quantidades de adiponectina, que atua diretamente no LH, inibindo a transcrição e diminuindo a secreção de andrógenos. O LH

estimula o funcionamento das CL [52, 59] e a redução desse hormônio pode levar à diminuição na produção da testosterona.

Manter o equilíbrio das enzimas que participam da síntese de andrógenos é importante para o funcionamento normal dos testículos [60]. Podemos observar no citoplasma das células de Leydig o retículo endoplasmático liso e as mitocôndrias, com muitas enzimas associadas à síntese de andrógenos, que precisam estar em equilíbrio [60]. Nossos achados revelaram que a genisteína (aglicona) diminuiu os níveis das enzimas HSD3B1 e HSD17B3. As isoflavonas glicosiladas (genisteína/daidzeína/gliciteína) aumentaram os níveis de CYP11A1, HSD3B e CYP17A1. Quando o colesterol atinge a matriz mitocondrial, ele é clivado pela enzima CYP11A1 em pregnenolona, que se difunde da mitocôndria e pode ser usada para a formação de hormônios esteroides como o estrogênio [61]. Também observamos que as isoflavonas glicosiladas (genisteína/daidzeína) induzem aumento nos níveis séricos de estradiol. A enzima HSD3B1 converte pregnenolona em progesterona [62, 63], ambos são precursores da biossíntese de testosterona e posteriormente do estradiol [61]. Para a síntese de andrógenos, uma cascata de enzimas é necessária para induzir a conversão da progesterona em  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona e depois em androstenediona [61-63]. Finalmente, a androstenediona é convertida pela ação da enzima HSD17B3 em testosterona [63, 64]. Essas mudanças levam à diminuição da produção de testosterona pelas CL. As mudanças encontradas indicam que as isoflavonas podem aumentar os níveis de estradiol e diminuir os níveis de testosterona, causando desequilíbrio das funções celulares em machos.

O aumento do estradiol também pode ser justificado pelo aumento da aromatase P450 que catalisa a biossíntese do estradiol usando testosterona como substrato [65]. Portanto, níveis elevados de estradiol devido à ingestão de isoflavonas podem indicar maior disponibilidade de substrato, como resultado do aumento da atividade da aromatase P450. O tecido adiposo, que é a principal fonte de estrogênio sérico em machos, além de expressar a aromatase P450, possui receptores de estrogênio (REs) que são alvos para receber estímulos antagônicos [65]. Assim, as isoflavonas podem se ligar aos REs no tecido adiposo para regular a biossíntese de estrogênio [65].

A proteína expressa pela Cx43 atua na comunicação célula-célula permitindo a sinalização de moléculas importantes para o desenvolvimento celular [66, 67]. Nos estudos incluídos, a expressão do gene Cx43 foi maior nas CL, epitélio seminífero, espermatogônia, espermatócitos e espermatozoides de animais tratados com a isoflavona aglicona (genisteína). A proteína expressa pelo gene Cx43 está fortemente associada à maturação, proliferação e

desenvolvimento de células germinativas das células de Sertoli [68, 69]. O aumento da expressão de Cx43 indica que a genistéina não prejudicou o desenvolvimento das gônadas nesses animais.

Os presentes achados revelaram que o equilíbrio hormonal foi alterado por todas as isoflavonas utilizadas. No entanto, mudanças nas funções moleculares via eixo HHG foram relatadas apenas para a isoflavona aglicona. A exposição a equol reduziu a expressão do gene do receptor do hormônio liberador de gonadotropina (GnRHR),  $E\alpha$  mRNA, TERP-1 e TERP-2, gene da subunidade beta do hormônio luteinizante (LH $\beta$ ) e subunidade alfa da gonadotrofina. A expressão de TERP-1 / -2 em ratos é sensível e regulada positivamente pelo estradiol [70, 71], indicando a ação estrogênica das isoflavonas. O equol também induziu aumento da expressão do gene  $E\alpha$  mRNA, estradiol e prolactina nos estudos incluídos. O gene  $E\alpha$  mRNA na glândula pituitária também é regulado pelo estrogênio [70, 71]. Altos níveis de estrogênio também podem inibir a proliferação das CL, induzir hiperplasia da glândula mamária em ratos machos, aumentar o risco de desenvolvimento de câncer [72, 73] e diminuir a secreção de testosterona. O aumento da atividade desses genes pela ação das isoflavonas indica que o equol possui capacidade estrogênica.

A diminuição dos níveis de LH e FSH relatada nos estudos incluídos também pode ser justificada pela diminuição do GnRHR na hipófise. Os níveis de FSH e LH mantêm a concentração da testosterona equilibrada, sendo essencial para a produção de espermatozoides [74]. O equol induz a diminuição da expressão de mRNA dos genes responsáveis por induzir a produção de andrógenos em áreas específicas do cérebro. Observou-se redução nos níveis de GnRH mRNA no MBH/ME e no MPOA/AH, que contém os neurônios que promovem o comportamento de acasalamento em ratos machos. Além disso, os estudos incluídos também relataram diminuição na expressão dos genes  $E\alpha$ , ER $\beta$  e do receptor de andrógeno (AR). O declínio na expressão do receptor GnRH na hipófise pode ser explicado por um mecanismo indireto, via redução da atividade dos genes GnRH hipotalâmicos [70, 71].

As isoflavonas podem afetar as estruturas testiculares agindo como desreguladores endócrinos. A desregulação endócrina durante a espermatogênese leva à produção de espermatozoides defeituosos, com problemas de motilidade, capacidade e viabilidade [75]. A diminuição no FSH, observada em nossos achados, pode causar redução nos níveis de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) e proteína ligadora de andrógenos (ABP), comprometendo a espermatogênese [67]. Estudos também indicaram que a ingestão de estrogênio causa diminuição nos níveis séricos de LH e FSH associada ao aumento nos níveis

séricos de prolactina [63]. A disfunção hormonal também pode causar alterações nas glândulas acessórias, uma vez que a testosterona também atua no funcionamento dos órgãos sexuais. Esses resultados indicam atividade estrogênica de todas as isoflavonas testadas. À medida que as alterações se tornam mais graves e aparentes, é possível observar a ação das isoflavonas, como diminuição do peso testicular e corporal, patologias, atrofia testicular, hipospermia e hiperplasia mamária.

A análise do peso corporal fornece informações importantes sobre a toxicidade geral de um composto e possíveis implicações para a saúde [51]. Os animais tratados com isoflavonas agliconas e glicosiladas, apresentaram redução no peso corporal, testicular, epididimário e das glândulas anexas. O peso e/ou tamanho testicular podem ser usados como indicadores da produção de espermatozoides, uma vez que seu principal componente é o túbulo seminífero [76]. As alterações encontradas indicam toxicidade testicular causada pelas isoflavonas, que podem prejudicar a produção de espermatozoides.

Todos os estudos selecionados encontraram alterações histopatológicas após a exposição às isoflavonas. Observamos que a exposição a isoflavonas agliconas e glicosiladas interrompeu a espermatogênese, aumentou a apoptose nas células germinativas e diminuiu o epitélio seminífero, além de causar desorganização e descolamento do epitélio seminífero. A ocorrência de morte celular e diminuição das células germinativas é refletida diretamente na contagem e na produção diária de espermatozoides [75, 77, 78]. Outras alterações como dissociação, desorganização, diminuição das células e volume nuclear das células do epitélio seminífero também foram encontradas. Mudanças na estrutura testicular podem desencadear mudanças funcionais que levam à infertilidade [52, 51, 58].

Reduções significativas na produção diária de espermatozoides (DSP) e na contagem de espermatozoides epididimários em camundongos expostos à genisteína foram relatadas. Esses achados concordam com outros estudos onde a exposição de roedores a compostos estrogênicos [79, 80] levou ao surgimento de histopatologias, como hipospermia e atrofia testicular. Animais tratados com isoflavonas agliconas (genisteína e genisteína/daidzeína/gliciteína) e glicosiladas, apresentaram diminuição na qualidade, viabilidade, contagem e produção de espermatozoides. A diminuição da qualidade dos espermatozoides pode resultar em infertilidade devido à capacidade reduzida dos espermatozoides chegarem ao local da fertilização, bem como sua capacidade de penetrar na zona pelúcida [11]. A exposição a isoflavonas reduz a fertilidade devido à expressão alterada dos receptores de esteroides e aumenta a peroxidação lipídica do

espermatozoide [75, 80]. No entanto, nenhum dos estudos avaliados relatou o estado oxidativo de animais expostos a isoflavonas.

As revisões sistemáticas são consideradas estudos de alto nível, que permitem a avaliação individual dos estudos de forma cega, usando ferramentas específicas [81]. Tais características levam a uma abordagem mais inclusiva e confiável, proporcionando um amplo entendimento dos estudos incluídos. No entanto, as discrepâncias entre os estudos revisados e os métodos incluídos são mostradas como limitações, considerando a grande variedade de características dos modelos animais, como idade, peso, número de animais e número de grupos experimentais. Outra limitação foi a grande variedade de doses (0,465 a 2000 mg/kg e 5 a 1250 mg/L). Se levarmos em consideração o fato de que a ingestão de isoflavonas resultante do consumo de soja em humanos adultos é em torno de 1 mg/kg por dia e formulações infantis em torno de 6 a 9 mg/kg por dia [14], as isoflavonas utilizadas nos estudos incluídos foram em doses altas. No entanto, muitos alimentos apresentam vestígios de soja, o que aumenta o nível de consumo diário.

## 5. CONCLUSÕES

O consumo de isoflavonas agliconas e glicosiladas foi prejudicial aos testículos, sendo as doses das glicosiladas de 50, 100, 146, 200, 300, 500 e 600 mg/kg e 190 e 1000 mg/L se mostraram mais nocivas. Além disso, altas doses de isoflavonas podem induzir alterações nas estruturas testiculares, como na microestrutura testicular, agindo diretamente na expressão de genes importantes para a produção de hormônios, levando a infertilidade dos animais experimentais. A administração de isoflavonas isoladas é mais eficiente na avaliação do efeito individual das estruturas testiculares. Entretanto, o composto conjugado (genisteína/daidzeína) foi o mais utilizado nos estudos. As principais patologias testiculares decorrentes da absorção de isoflavonas estão associadas às células de Leydig e são resultado de alterações nas funções moleculares e nos componentes celulares. No entanto, mais estudos são necessários para analisar o estado oxidativo dos testículos, para entender a ação das isoflavonas nas células de Leydig e para avaliar a via que leva à alteração dos receptores androgênicos nas células de Sertoli e às alterações histopatológicas no epitélio seminífero.

### **Conflitos de interesse**

Os autores deste manuscrito declaram não ter conflitos de interesse a declarar.

**Declaração de disponibilidade de dados**

Os dados que suportam os resultados deste estudo estão disponíveis no artigo.

**Contribuições dos autores**

Amanda Alves Lozi, Mariáurea Matias Sarandy e Reggiani Vilela Gonçalves contribuíram igualmente para este trabalho. Sérgio Luis Pinto da Matta, Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo, Rômulo Dias Novaes e Diane Costa de Araújo contribuíram com a análise dos dados e leitura final do manuscrito.

## 6. REFERÊNCIAS

1. Strauss L., Santti R., Saarinen N., Streng T., Joshi S., Mäkelä S. Dietary phytoestrogens and their role in hormonally dependent disease. *Toxicology Letters*. 1998;102-103:349–354. doi: 10.1016/s0378-4274(98)00332-4.
2. Retana-Márquez S., Hernandez A., Romero C., et al. Effects of phytoestrogens on mammalian reproductive physiology. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 2012;15(1):129–145.
3. Navarro M. C. Mecanismo de acción de las isoflavonas. *Ginecología y Obstetricia Clínica*. 2005;6:159–165.
4. Bu L., Stechell K. D., Lephart E. D. Influences of dietary soy isoflavones on metabolism but not nociception and stress hormone responses in ovariectomized female rats. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2005;26:3–8.
5. Medigovic I. M., Zivanovic J. B., Aidzanovic V. Z., et al. Effects of soy phytoestrogens on pituitary-ovarian function in middle-aged female rats. *Endocrine*. 2015;50(3):764–776.
6. Strom S. S., Yamamura Y., Duphorne C. M., et al. Phytoestrogen intake and prostate cancer: a case-control study using a new database. *Nutrition and Cancer*. 1999;33(1):20–25. doi: 10.1080/01635589909514743.
7. McCormick D. L., Johnson W. D., Bosland M. C., Lubet R. A., Steele V. E. Chemoprevention of rat prostate carcinogenesis by soy isoflavones and by Bowman-Birk inhibitor. *Nutrition and Cancer*. 2007;57(2):184–193. doi: 10.1080/01635580701277478.
8. Zhou J.-R., Li L., Pan W. Dietary soy and tea combinations for prevention of breast and prostate cancers by targeting metabolic syndrome elements in mice. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2007;86(3):882S–888S. doi: 10.1093/ajcn/86.3.882s.
9. Srilatha B., Adaikan P. G. O estrogen-androgen crosstalk in the pathophysiology of erectile dysfunction. *Asian Journal of Andrology*. 2003;5(4):307–313. [PubMed] [Google Scholar]
10. Branca F., Lorenzetti S. Health effects of phytoestrogens. *Forum Nutrition*. 2005;5:110–111.
11. Grier H. J. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In: Russel in L. D., Griswold M. D., editors. *The Sertoli Cell*. Clearwater, FL, USA: Cache River Press; 1993. pp. 703–739.
12. Kuladip J., Subarna J., Kumar P. S. Effects of chronic exposure to sodium arsenite on hypothalamo-pituitary-testicular activities in adult rats: possible an estrogenic mode of action. *Reproduction Biology Endocrinology*. 2006;4:4–9.

13. Lima G. D. D. A., Sertorio M. N., Souza A. C. F., et al. Fertility in male rats: disentangling adverse effects of arsenic compounds. *Reproductive Toxicology*. 2018;78:130–140. doi: 10.1016/j.reprotox.2018.04.015.
14. Setchell K. D., Zimmer-Nechemias L., Cai J., Heubi J. E. Exposure of infants to phyto-oestrogens from soy-based infant formula. *The Lancet*. 1997;350(9070):23–27. doi: 10.1016/s0140-6736(96)09480-9.
15. Folman Y., Pope G. S. The interaction in the immature mouse of potent oestrogens with coumestrol, genistein and other utero-vaginitrophic compounds of low potency. *Journal of Endocrinology*. 1966;34(2):215–225. doi: 10.1677/joe.0.0340215.
16. Kreiger D. T., Porlow M. J., Gibson M. J., Davis T. F. Brain grafts reverse hypogonadism of gonadotropin releasing hormone deficiency. *Nature*. 1982;298:468–471.
17. Chavarro J. E., Toth T. L., Sadio S. M., Hauser R. Soy food and isoflavone intake in relation to semen quality parameters among men from an infertility clinic. *Human Reproduction*. 2008;23(11):2584–2590. doi: 10.1093/humrep/den243. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
18. Najaf M. N., Ghazanfarpour M. Effect of phytoestrogens on sexual function in menopausal women: a systematic review and meta-analysis. *Climacteric*. 2018;21(5):437–445. [PubMed] [Google Scholar]
19. Moher D., Liberati A., Tetzlaff J., Altman D. G. The PRISMA group. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLOS Medicine*. 2009;6(7):1–6. doi: 10.1371/journal.pmed.1000097.
20. Hoojimans C. R., Tilema A., Leenaars M., Ritskes-Hoitinga M. Enhancing search efficiency by means of a search filter for finding all studies on animal experimentation. *Laboratory Animals*. 2010;44(3):170–175.
21. Pereira R. M., Greco G. M. Z., Moreira A. M., et al. Applicability of plant-based products in the treatment of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei* infections: a systematic review of preclinical in vivo evidence. *Parasitology*. 2017;144(10):1275–1287. doi: 10.1017/s0031182017000634. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
22. Chen E. Y., Tan C. M., Kou Y., et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics*. 2013;128:p. 14.
23. Kuleshov M. V., Jones M. R., Rouillard A. D., et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Research*. 2016;9.

24. Hoojimans C. R., Rovers M. M., Vries R., et al. “SYRCLE’s risk of bias tool for animal studies. BMC Medical Research Methodology. 2014;14(43):1–9.
25. East J. The effect of genistein on the fertility of mice. Journal of Endocrinology. 1955;13(1):94–100. doi: 10.1677/joe.0.0130094.
26. Roberts D., Veeramachaneni D. N. R., Schlaff W. D., Awoniyi C. A. Effects of chronic dietary exposure to genistein, a phytoestrogen, during various stages of development on reproductive hormones and spermatogenesis in rats. Endocrine. 2000;13(3):281–286. doi: 10.1385/endo:13:3:281.
27. Delclos K. B., Bucci T. J., Lomax L. G., et al. Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD (Sprague-Dawley) rats. Reproductive Toxicology. 2001;15(6):647–663. doi: 10.1016/s0890-6238(01)00177-0.
28. Robertson K. M., O’Donnell L., Simpson E. R., Jones M. E. E. The phenotype of the aromatase knockout mouse reveals dietary phytoestrogens impact significantly on testis function. Endocrinology. 2015;143(9):2913–2921.
29. Cline J. M., Franke A. A., Register T. C., Golden D. L., Adams M. R. Effects of dietary isoflavone aglycones on the reproductive tract of male and female mice. Toxicologic Pathology. 2004;32(1):91–99. doi: 10.1080/01926230490265902.
30. Lee B. J., Kang J. K., Jung E. Y., et al. Exposure to genistein does not adversely affect the reproductive system in adult male mice adapted to a soy-based commercial diet. Journal of Veterinary Science. 2004;5(3):227–234. doi: 10.4142/jvs.2004.5.3.227.
31. Mcvey M. J., Cooke G. M., Curran I. H. A. Increased serum and testicular androgen levels in F1 rats with lifetime exposure to soy isoflavones. Reproductive Toxicology. 2004;18(5):677–685. doi: 10.1016/j.reprotox.2004.04.005.
32. Faqi A. S., Johnson W. D., Morrissey R. L., McCormick D. L. Reproductive toxicity assessment of chronic dietary exposure to soy isoflavones in male rats. Reproductive Toxicology. 2004;18(4):605–611. doi: 10.1016/j.reprotox.2004.02.013.
33. Jaroenporn S., Malaivijitnond S., Wattanasirmit K., et al. Effects of *Pueraria mirifica*, an herb containing phytoestrogens, on reproductive organs and fertility of adult male mice. Endocrine. 2006;30(1):93–102. doi: 10.1385/endo:30:1:93.
34. Assinder S., Davis R., Fenwick M., Glover A. Adult-only exposure of male rats to a diet of high phytoestrogen content increases apoptosis of meiotic and post-meiotic germ cells. Reproduction. 2007;133(1):11–19.

35. Akingbemi B. T., Braden T. D., Kemppainen B. W. Exposure to phytoestrogens in the perinatal period affects androgen secretion by testicular Leydig cells in the adult rat. *Endocrinology*. 2015;148(9):4475–4488.
36. Guan L., Huang Y., Chen Z.-Y. Developmental and reproductive toxicity of soybean isoflavones to immature SD rats. *Biomedical and Environmental Sciences*. 2008;21(3):197–204. doi: 10.1016/s0895-3988(08)60029-x.
37. Sherrill J. D., Sparks M., Dennis J., et al. Developmental exposures of male rats to soy isoflavones impact Leydig cell Differentiation1. *Biology of Reproduction*. 2010;83(3):488–501. doi: 10.1095/biolreprod.109.082685.
38. Cederroth C. R., Zimmermann C., Beny J.-L., et al. Potential detrimental effects of a phytoestrogen-rich diet on male fertility in mice. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2010;321(2):152–160. doi: 10.1016/j.mce.2010.02.011.
39. Piotrowska K., Baranowska-Bosiacka I., Marchlewicz M., et al. Changes in male reproductive system and mineral metabolism induced by soy isoflavones administered to rats from prenatal life until sexual maturity. *Nutrition*. 2011;27(3):372–379. doi: 10.1016/j.nut.2010.03.010.
40. Ekaluo U. B., Udoh P. B., Ikpeme E. V., Udensi O. Effect of soybean (*Glycine max* L.) on the hormonal milieu of male rats. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2011;14(14):752–754. doi: 10.3923/pjbs.2011.752.754.
41. Modaresi M., Messripour M., Khorami H. Effect of soybean on male reproductive physiology in mice. *Proceedings of the International Conference on Life Science and Technology*; 2011; pp. 15–18.
42. Pfaehler A., Nanjappa M. K., Coleman E. S., et al. Regulation of adiponectin secretion by soy isoflavones has implication for endocrine function of the testis. *Toxicology Letters*. 2012;209(1):78–85. doi: 10.1016/j.toxlet.2011.11.027.
43. Loutchanwoot P., Srivilai P., Jarry H. Effects of the natural endocrine disruptor equol on the pituitary function in adult male rats. *Toxicology*. 2013;304:69–75. doi: 10.1016/j.tox.2012.11.017.
44. Musameh N. I., Zin S. R., Kassim N. M. Effects of genistein on male sprague dawley rats reproductive development. *Biomedical Research*. 2014;25(3):391–400.
45. Loutchanwoot P., Srivilai P., Jarry H. Lack of anti-androgenic effects of equol on reproductive neuroendocrine function in the adult male rat. *Hormones and Behavior*. 2014;65(1):22–31. doi: 10.1016/j.yhbeh.2013.10.013.
46. Meena R., Supriya C., Pratap Reddy K., Sreenivasula Reddy P. Altered spermatogenesis, steroidogenesis and suppressed fertility in adult male rats exposed to genistein, a non-steroidal

- phytoestrogen during embryonic development. *Food and Chemical Toxicology*. 2017;99:70–77. doi: 10.1016/j.fct.2016.11.020.
47. Setchell K. D., Brown N. M., Zimmer-Nechemias L., et al. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2002;76(2):447–453. doi: 10.1093/ajcn/76.2.447.
48. Xu X., Harris K. S., Wang H.-J., Murphy P. A., Hendrich S. Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women. *The Journal of Nutrition*. 1995;125(9):2307–2315. doi: 10.1093/jn/125.9.2307.
49. Murphy P. A. Phytoestrogen content of processed soybean products. *Food Technology*. 1982;36(1):60–64. [Google Scholar]
50. Molteni A., Brisio-Molteni L., Persky V. In vitro hormonal effects of soybean isoflavonas. *Journal of Nutrition*. 1995;125:751S–756S.
51. França L. R., Russell L. D. The testis of domestic mammals. In: Martinez-Garcia F., Regadera J., editors. *Male Reproduction - a Multidisciplinary Overview*. Madrid, Spain: Churchill Communications; 1998. pp. 198–219.
52. Russell L. D., Ettl R. A., Hikim A. P. S., Clegg E. D. Mammalian spermatogenesis, In: Russell L. D., Ettl R. A., Hikim A. P. S., Clegg E. D., editors. *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Bolesta, MO, USA: Cache River Press; 1990. pp. 1–40.
53. Wisniewski A. B., Klein S. L., Lakshmanan Y., Gearhart J. P. Exposure to genistein during gestation and lactation demasculinizes the reproductive system in rats. *Journal of Urology*. 2003;169(4):1582–1586. doi: 10.1097/01.ju.0000046780.23389.e0.
54. Dalu A., Blaydes B., Bryant C., et al. Estrogen receptor expression in the prostate of rats treated with dietary genistein. *Journal of Chromatography*. 2002;777(1-2):249–260. doi: 10.1016/s1570-0232(02)00346-x.
55. Tan K. A. L., Walker M., Morris K., Greig I., Mason J. I., Sharpe R. M. Infant feeding with soy formula milk: effects on puberty progression, reproductive function and testicular cell numbers in marmoset monkeys in adulthood. *Human Reproduction*. 2006;21(4):896–904. doi: 10.1093/humrep/dei421.
56. Lukas J., Herzinger T., Hansen K., et al. Cyclin E-induced S phase without activation of the pRb/E2F pathway. *Genes and Development*. 1997;11(11):1479–1492. doi: 10.1101/gad.11.11.1479.

57. Leng X., Connell-Crowley L., Goodrich D., Harper J. W. S-phase entry upon ectopic expression of G1 cyclin-dependent kinases in the absence of retinoblastoma protein phosphorylation. *Current Biology*. 1997;7(9):709–712. doi: 10.1016/s0960-9822(06)00301-0.
58. Levin E. R. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Molecular Endocrinology*. 2005;19(8):1951–1959. doi: 10.1210/me.2004-0390. [PMC free article]
59. Rodriguez-Pacheco F., Martinez-Fuentes A. J., Tovar S., et al. Regulation of pituitary cell function by adiponectin. *Endocrinology*. 2007;148(1):401–410. doi: 10.1210/en.2006-1019.
60. Russel L. D., Ettlin R. A., Hikim A. P. S., Clegg E. D. Histological and histopathological evaluation of the testis. *International Journal of Andrology*. 1993;16(1):p. 83. doi: 10.1111/j.1365-2605.1993.tb01156.x.
61. Martinez-Arguelles D. B., Papadopoulos V. Epigenetic regulation of the expression of genes involved in steroid hormone biosynthesis and action. *Steroids*. 75:467–476.
62. Simard J., Ricketts M.-L., Gingras S., Soucy P., Feltus F. A., Melner M. H. Molecular biology of the 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/d5-d4 isomerase gene family. *Endocrine Reviews*. 2005;26(4):525–582. doi: 10.1210/er.2002-0050.
63. Hu G.-X., Zhao B.-H., Chu Y.-H., et al. Effects of genistein and equol on human and rat testicular 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 3 activities. *Asian Journal of Andrology*. 2010;12(4):519–526. doi: 10.1038/aja.2010.18.
64. Stocco D. M. The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future. *The Journal of Endocrinology*. 2000;164(1):247–253. doi: 10.1677/joe.0.1640247.
65. Cooke P. S., Naaz A. Role of estrogens in adipocyte development and function. *Experimental Biology and Medicine*. 2004;229(11):1127–1135. doi: 10.1177/153537020422901107.
66. Niessen H., Harz H., Bedner P., Krämer K., Willecke K. J. Selective permeability of different connexin channels to the second messenger inositol 1,4,5- trisphosphate. *Journal of Cell Science*. 2000;8:1365–1372.
67. Stains J. P., Civitelli R. Gap junctions in skeletal development and function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2005;1719(1-2):69–81. doi: 10.1016/j.bbamem.2005.10.012.
68. Batias C., Defamie N., Lablack A., et al. Modified expression of testicular gap-junction connexin 43 during normal spermatogenic cycle and in altered spermatogenesis. *Cell and Tissue Research*. 1999;298(1):113–121. doi: 10.1007/s004419900076.

69. Risley M. S., Tan I. P., Roy C., Saez J. C. Cell, age and stage dependent distribution of connexin43 gap junctions in testes. *Journal of Cell Science*. 1992;103(1):81–96.
70. Friend K. E., Resnick E. M., Ang L. W., Shupnik M. A. Specific modulation of estrogen receptor mRNA isoforms in rat pituitary throughout the estrous cycle and in response to steroid hormones. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 1997;131(2):147–155. doi: 10.1016/s0303-7207(97)00098-1.
71. Mitchner N. A., Garlick C., Ben-Jonathan N. Cellular distribution and gene regulation of estrogen receptors $\alpha$  and  $\beta$  in the rat pituitary Gland1. *Endocrinology*. 1998;139(9):3976–3983. doi: 10.1210/endo.139.9.6181.
72. Latendresse J. R., Bucci T. J., Olson G., et al. Genistein and ethinyl estradiol dietary exposure in multigenerational and chronic studies induce similar proliferative lesions in mammary gland of male Sprague-Dawley rats. *Reproductive Toxicology*. 2009;28(3):342–353. doi: 10.1016/j.reprotox.2009.04.006.
73. Martinez J., Lewi J. An unusual case of gynecomastia associated with soy product consumption. *Endocrine Practice*. 2008;14(4):415–418. doi: 10.4158/ep.14.4.415.
74. Toppari J., Larsen J. C., Christiansen P., et al. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environmental Health Perspectives*. 1996;104(4):741–803. doi: 10.2307/3432709.
75. Fernandez C. D. B., Porto E. M., Arena A. C., Kempinas W. D. G. Effects of altered epididymal sperm transit time on sperm quality. *International Journal of Andrology*. 2008;31(4):427–437. doi: 10.1111/j.1365-2605.2007.00788.x.
76. O'Connor J. C., Frame S. R., Ladics G. S. Evaluation of a 15-day screening assay using intact male rats for identifying antiandrogens. *Toxicological Sciences*. 2002;69(1):92–108. [PubMed] [Google Scholar]
77. Carlsen E., Giwercman A., Keiding N., Skakkebaek N. E. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Bmj*. 1992;305(6854):609–613. doi: 10.1136/bmj.305.6854.609. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
78. Verstegen J., Iguer-Ouada M., Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 2002;57(1):149–179. doi: 10.1016/s0093-691x(01)00664-1.
79. Sharpe R. M., Atanassova N., McKinnell C., et al. Abnormalities in functional development of the Sertoli cells in rats treated neonatally with diethylstilbestrol: a possible role for estrogens in Sertoli cell Development1. *Biology of Reproduction*. 1998;59(5):1084–1094. doi: 10.1095/biolreprod59.5.1084.

80. Glover A., Assinder S. J. Acute exposure of adult male rats to dietary phytoestrogens reduces fecundity and alters epididymal steroid hormone receptor expression. *Journal of Endocrinology*. 2006;189(3):565–573. doi: 10.1677/joe.1.06709.
81. Landis S. C., Amara S. G., Asadullah K., et al. A call for transparent reporting to optimize the predictive value of preclinical research. *Nature*. 2012;490(7419):187–191. doi: 10.1038/nature11556.

**Tabela S1.** Filtros de pesquisa usados nas bases de dados PubMed, Scopus e Web of Science.

| <b>DESCRITORES DE PESQUISA</b>  |   |   |
|---|---|---|
| <b>PUBMED</b>   |   |   |
| <i><b>ANIMAIS DE LABORATÓRIO PARTE 2</b></i>  | <i><b>TESTÍCULOS</b></i>  | <i><b>ISOFLAVONAS</b></i>   |
| ["animal experimentation"[MeSH Terms] OR "models, animal"[MeSH Terms] OR "invertebrates"[MeSH Terms] OR "Animals"[Mesh:noexp] OR "animal population groups"[MeSH Terms] OR "chordata"[MeSH Terms:noexp] OR "chordata, nonvertebrate"[MeSH Terms] OR "vertebrates"[MeSH Terms:noexp] OR "amphibians"[MeSH Terms] OR "birds"[MeSH Terms] OR "fishes"[MeSH Terms] OR "reptiles"[MeSH Terms] OR "mammals"[MeSH Terms:noexp] OR "primates"[MeSH Terms:noexp] OR "artiodactyla"[MeSH Terms] OR "carnivora"[MeSH Terms] OR "cetacea"[MeSH Terms] OR "chiroptera"[MeSH Terms] OR "elephants"[MeSH Terms] OR "hyraxes"[MeSH Terms] OR "insectivora"[MeSH Terms] OR "lagomorpha"[MeSH Terms] OR "marsupialia"[MeSH Terms] OR "monotremata"[MeSH Terms] OR "perissodactyla"[MeSH Terms] OR "rodentia"[MeSH Terms] OR "scandentia"[MeSH Terms] OR | ["testis"[MeSH Terms] OR "testicle"[ MeSH Terms] OR "testicles"[MeSH Terms] OR "testes"[ MeSH Terms] OR "spermatogenesis"[MeSH Terms] OR "testosterone"[MeSH Terms] OR "spermatogonia"[MeSH Terms] OR "spermatogonias"[MeSH Terms] OR "spermatocyte"[MeSH Terms] OR "spermatocytes"[MeSH Terms] OR "spermatid"[MeSH Terms] OR "spermatids"[MeSH Terms] OR "leydig cells"[MeSH Terms] OR "blood-testis barrier"[MeSH Terms] OR "seminiferous epithelium"[MeSH Terms] OR "Sertoli cells"[MeSH Terms] OR "testis"[TIAB] OR "testicle"[TIAB] OR "testicles"[TIAB] OR "testes"[TIAB] OR "spermatogenesis"[TIAB] OR "testosterone"[TIAB] OR | (TITLE-ABS-KEY("phytoestrogens") OR TITLE-ABS-KEY("phytoestrogen") OR TITLE-ABS-KEY("plant estrogen") OR TITLE-ABS-KEY("estrogen, plant") OR TITLE-ABS-KEY("plant estrogens") OR TITLE-ABS-KEY("estrogens, plant") OR TITLE-ABS-KEY("phyto-estrogen") OR TITLE-ABS-KEY("phyto- estrogen") OR TITLE-ABS-KEY("estrogen-like plant extracts") OR TITLE-ABS-KEY("estrogen like plant extracts") OR TITLE-ABS-KEY("extracts, estrogen-like plant") OR TITLE-ABS-KEY("plant extracts, estrogen-like") OR TITLE-ABS-KEY("androgen antagonists") OR TITLE-ABS-KEY("isoflafone") OR TITLE-ABS-KEY("isoflavones") OR TITLE-ABS-KEY("isoflavone derivatives") OR TITLE-ABS-KEY("derivatives, isoflavone") OR |

|   |  |   |
|---|--|---|
| "sirenia"[MeSH Terms] OR "xenarthra"[MeSH Terms] OR "haplorhini"[MeSH Terms:noexp] OR "strepsirhini"[MeSH Terms] OR "platyrrhini"[MeSH Terms] OR "tarsii"[MeSH Terms] OR "catarrhini"[MeSH Terms:noexp] OR "cercopithecidae"[MeSH Terms] OR "hylobatidae"[MeSH Terms] OR "hominidae"[MeSH Terms:noexp] OR "gorilla gorilla"[MeSH Terms] OR "pan paniscus"[MeSH Terms] OR "pan troglodytes"[MeSH Terms] OR "pongo pygmaeus"[MeSH Terms]] | "spermatogonia"[Tiab] OR "spermatogonias"[TIAB] OR "spermatocyte"[TIAB] OR "spermatocytes"[Tiab] OR "spermatid"[Tiab] OR "spermatids"[TIAB] OR "leydig cells"[TIAB] OR "seminiferous tubules"[TIAB] OR "blood-testis barrier"[TIAB] OR "seminiferous epithelium"[TIAB] OR "Sertoli cells"[TIAB]] | TITLE-ABS-KEY("genistein") OR TITLE-ABS-KEY("daidzein") OR TITLE-ABS-KEY("glycine") OR TITLE-ABS-KEY("formononetine") OR TITLE-ABS-KEY("biocanin A") OR TITLE-ABS-KEY("equol")) |
|---|--|---|

**Tabela S1 (Continuação).** Filtros de pesquisa usados nas bases de dados PubMed, Scopus e Web of Science.

| <i><b>ANIMAIS DE LABORATÓRIO PARTE 2</b></i>  |
|---|
| [animals[TIAB] OR animal[TIAB] OR mice[TIAB] OR mus[TIAB] OR mouse[TIAB] OR murine[TIAB] OR woodmouse[TIAB] OR rats[TIAB] OR rat[TIAB] OR murinae[TIAB] OR muridae[TIAB] OR cottonrat[TIAB] OR cottonrats[TIAB] OR hamster[TIAB] OR hamsters[TIAB] OR cricetinae[TIAB] OR rodentia[TIAB] OR rodent[TIAB] OR rodents[TIAB] OR pigs[TIAB] OR pig[TIAB] OR swine[TIAB] OR swines[TIAB] OR piglets[TIAB] OR piglet[TIAB] OR boar[TIAB] OR boars[TIAB] OR "sus scrofa"[TIAB] OR ferrets[TIAB] OR ferret[TIAB] OR polecat[TIAB] OR polecats[TIAB] OR "mustela putorius"[TIAB] OR "guinea pigs"[TIAB] OR "guinea pig"[TIAB] OR cavia[TIAB] OR callithrix[TIAB] OR marmoset[TIAB] OR marmosets[TIAB] OR cebuella[TIAB] OR hapale[TIAB] OR octodon[TIAB] OR chinchilla[TIAB] OR chinchillas[TIAB] OR gerbillinae[TIAB] OR gerbil[TIAB] OR gerbils[TIAB] OR jird[TIAB] OR jirds[TIAB] OR merione[TIAB] OR meriones[TIAB] OR rabbits[TIAB] OR rabbit[TIAB] OR hares[TIAB] OR hare[TIAB] OR diptera[TIAB] OR flies[TIAB] OR fly[TIAB] OR dipteral[TIAB] OR drosophila[TIAB] OR drosophilidae[TIAB] OR cats[TIAB] OR cat[TIAB] OR carus[TIAB] OR felis[TIAB] OR nematoda[TIAB] OR nematode[TIAB] OR nematoda[TIAB] |

OR nematode[TIAB] OR nematodes[TIAB] OR sipunculida[TIAB] OR dogs[TIAB] OR dog[TIAB] OR canine[TIAB] OR canines[TIAB] OR canis[TIAB] OR sheep[TIAB] OR sheeps[TIAB] OR mouflon[TIAB] OR mouflons[TIAB] OR ovis[TIAB] OR goats[TIAB] OR goat[TIAB] OR capra[TIAB] OR capras[TIAB] OR rupicapra[TIAB] OR chamois[TIAB] OR haplorhini[TIAB] OR monkey[TIAB] OR monkeys[TIAB] OR anthropoidea[TIAB] OR anthropoids[TIAB] OR saguinus[TIAB] OR tamarin[TIAB] OR tamarins[TIAB] OR leontopithecus[TIAB] OR hominidae[TIAB] OR ape[TIAB] OR apes[TIAB] OR pan[TIAB] OR paniscus[TIAB] OR "pan paniscus"[TIAB] OR bonobo[TIAB] OR bonobos[TIAB] OR troglodytes[TIAB] OR "pan troglodytes"[TIAB] OR gibbon[TIAB] OR gibbons[TIAB] OR siamang[TIAB] OR siamangs[TIAB] OR nomascus[TIAB] OR symphalangus[TIAB] OR chimpanzee[TIAB] OR chimpanzees[TIAB] OR prosimians[TIAB] OR "bush baby"[TIAB] OR prosimian[TIAB] OR bush babies[TIAB] OR galagos[TIAB] OR galago[TIAB] OR pongidae[TIAB] OR gorilla[TIAB] OR gorillas[TIAB] OR pongo[TIAB] OR pygmaeus[TIAB] OR "pongo pygmaeus"[TIAB] OR orangutans[TIAB] OR pygmaeus[TIAB] OR lemur[TIAB] OR lemurs[TIAB] OR lemuriidae[TIAB] OR horse[TIAB] OR horses[TIAB] OR pongo[TIAB] OR equus[TIAB] OR cow[TIAB] OR calf[TIAB] OR bull[TIAB] OR chicken[TIAB] OR chickens[TIAB] OR gallus[TIAB] OR quail[TIAB] OR bird[TIAB] OR birds[TIAB] OR quails[TIAB] OR poultry[TIAB] OR poultries[TIAB] OR fowl[TIAB] OR fowls[TIAB] OR reptile[TIAB] OR reptilia[TIAB] OR reptiles[TIAB] OR snakes[TIAB] OR snake[TIAB] OR lizard[TIAB] OR lizards[TIAB] OR alligator[TIAB] OR alligators[TIAB] OR crocodile[TIAB] OR crocodiles[TIAB] OR turtle[TIAB] OR turtles[TIAB] OR amphibian[TIAB] OR amphibians[TIAB] OR amphibia[TIAB] OR frog[TIAB] OR frogs[TIAB] OR bombina[TIAB] OR salientia[TIAB] OR toad[TIAB] OR toads[TIAB] OR "epidalea calamita"[TIAB] OR salamander[TIAB] OR salamanders[TIAB] OR eel[TIAB] OR eels[TIAB] OR fish[TIAB] OR fishes[TIAB] OR pisces[TIAB] OR catfish[TIAB] OR catfishes[TIAB] OR siluriformes[TIAB] OR arius[TIAB] OR heteropneustes[TIAB] OR sheatfish[TIAB] OR perch[TIAB] OR perches[TIAB] OR percidae[TIAB] OR perca[TIAB] OR trout[TIAB] OR trouts[TIAB] OR char[TIAB] OR chars[TIAB] OR salvelinus[TIAB] OR "fathead minnow"[TIAB] OR minnow[TIAB] OR cyprinidae[TIAB] OR carps[TIAB] OR carp[TIAB] OR zebrafish[TIAB] OR zebrafishes[TIAB] OR goldfish[TIAB] OR goldfishes[TIAB] OR guppy[TIAB] OR guppies[TIAB] OR chub[TIAB] OR chubs[TIAB] OR tinca[TIAB] OR barbels[TIAB] OR barbuis[TIAB] OR pimephales[TIAB] OR promelas[TIAB] OR "poecilia reticulata"[TIAB] OR mullet[TIAB] OR mullets[TIAB] OR seahorse[TIAB] OR seahorses[TIAB] OR mugil curema[TIAB] OR atlantic cod[TIAB] OR shark[TIAB] OR sharks[TIAB] OR catshark[TIAB] OR anguilla[TIAB] OR salmonid[TIAB] OR salmonids[TIAB] OR whitefish[TIAB] OR whitefishes[TIAB] OR salmon[TIAB] OR salmons[TIAB] OR sole[TIAB] OR solea[TIAB] OR "sea lamprey"[TIAB] OR lamprey[TIAB] OR lampreys[TIAB] OR

**Tabela S1 (Continuação).** Filtros de pesquisa usados nas bases de dados PubMed, Scopus e Web of Science.

| <i><b>ANIMAIS DE LABORATÓRIO PARTE 2</b></i>  |  |
|---|--|
| pumpkinseed[TIAB] OR sunfish[TIAB] OR sunfishes[TIAB] OR tilapia[TIAB] OR tilapias[TIAB] OR turbot[TIAB] OR turbot[TIAB] OR flatfish[TIAB] OR flatfishes[TIAB] OR sciuridae[TIAB] OR squirrel[TIAB] OR squirrels[TIAB] OR chipmunk[TIAB] OR chipmunks[TIAB] OR suslik[TIAB] OR susliks[TIAB] OR vole[TIAB] OR voles[TIAB] OR lemming[TIAB] OR lemmings[TIAB] OR muskrat[TIAB] OR muskrats[TIAB] OR lemmus[TIAB] OR otter[TIAB] OR otters[TIAB] OR marten[TIAB] OR martens[TIAB] OR martes[TIAB] OR weasel[TIAB] OR badger[TIAB] OR badgers[TIAB] OR ermine[TIAB] OR mink[TIAB] OR minks[TIAB] OR sable[TIAB] OR sables[TIAB] OR gulo[TIAB] OR gulos[TIAB] OR wolverine[TIAB] OR wolverines[TIAB] OR minks[TIAB] OR mustela[TIAB] OR llama[TIAB] OR llamas[TIAB] OR alpaca[TIAB] OR alpacas[TIAB] OR camelid[TIAB] OR camelids[TIAB] OR guanaco[TIAB] OR guanacos[TIAB] OR chiroptera[TIAB] OR chiropteras[TIAB] OR bat[TIAB] OR bats[TIAB] OR fox[TIAB] OR foxes[TIAB] OR iguana[TIAB] OR iguanas[TIAB] OR xenopus laevis[TIAB] OR parakeet[TIAB] OR parakeets[TIAB] OR parrot[TIAB] OR parrots[TIAB] OR donkey[TIAB] OR donkeys[TIAB] OR mule[TIAB] OR mules[TIAB] OR zebra[TIAB] OR zebras[TIAB] OR shrew[TIAB] OR shrews[TIAB] OR bison[TIAB] OR bisons[TIAB] OR buffalo[TIAB] OR buffaloes[TIAB] OR deer[TIAB] OR deers[TIAB] OR bear[TIAB] OR bears[TIAB] OR panda[TIAB] OR pandas[TIAB] OR "wild hog"[TIAB] OR "wild boar"[TIAB] OR fitchew[TIAB] OR fitch[TIAB] OR beaver[TIAB] OR beavers[TIAB] OR jerboa[TIAB] OR jerboas[TIAB] OR capybara[TIAB] OR capybaras[TIAB]) NOT medline[subset]] |  |
| <b>SCOPUS</b>   |  |
| <i><b>TESTÍCULOS</b></i>  | <i><b>ISOFLAVONAS</b></i>  |
| ((TITLE-ABS-KEY("testis") OR TITLE-ABS-KEY("testicle") OR TITLE-ABS-KEY("testicles") OR TITLE-ABS-KEY("testes") OR TITLE-ABS-KEY("spermatogenesis") OR TITLE-ABS-KEY("testosterone") OR TITLE-ABS-KEY("spermatogonia") OR TITLE-ABS-  | (TITLE-ABS-KEY("phytoestrogens") OR TITLE-ABS-KEY("phytoestrogen") OR TITLE-ABS-KEY("plant estrogen") OR TITLE-ABS-KEY("estrogen, plant") OR TITLE-ABS-KEY("plant estrogens") OR TITLE-ABS-KEY("estrogens, plant") OR TITLE-ABS-KEY("phyto-estrogen") OR TITLE-ABS-KEY("phyto- estrogen") OR TITLE-ABS-KEY("estrogen-like plant extracts") OR TITLE-ABS-KEY("estrogen like |

|  |  |
|--|--|
| KEY("spermatogonias") OR TITLE-ABS-KEY("spermatocyte") OR ("spermatocytes") OR TITLE-ABS-KEY("spermatid") OR TITLE-ABS-KEY("spermatids") OR TITLE-ABS-KEY("leydig cells") OR TITLE-ABS-KEY("seminiferous tubules") OR TITLE-ABS-KEY("blood-testis barrier") OR TITLE-ABS-KEY("seminiferous epithelium") OR TITLE-ABS-KEY("Sertoli cells")) | plant extracts") OR TITLE-ABS-KEY("extracts, estrogen-like plant") OR TITLE-ABS-KEY("plant extracts, estrogen-like") OR TITLE-ABS-KEY("androgen antagonists") OR TITLE-ABS-KEY("isoflafone") OR TITLE-ABS-KEY("isoflavones") OR TITLE-ABS-KEY("isoflavone derivatives") OR TITLE-ABS-KEY("derivatives, isoflavone") OR TITLE-ABS-KEY("genistein") OR TITLE-ABS-KEY("daidzein") OR TITLE-ABS-KEY("glycine") OR TITLE-ABS-KEY("formononetine") OR TITLE-ABS-KEY("biocanin A") OR TITLE-ABS-KEY("equol")) |
|--|--|

**Tabela S1 (Continuação).** Filtros de pesquisa usados nas bases de dados PubMed, Scopus e Web of Science.

| <b>WEB OF SCIENCE</b>  |  |   |
|--|--|---|
| <b><i>ANIMAIS</i></b>  | <b><i>TESTÍCULOS</i></b>   | <b><i>ISOFLAVONAS</i></b>   |
| TS=Mice OR TS=Mouse OR TS=Rat OR TS=Rats OR TS=Dog OR TS=Dogs OR TS=Rabbits OR TS=Murine model OR TS=Guinea pig OR TS=Hamster OR TS=Animal model | TS=testis OR TS=testicle OR TS=testicles OR TS=testes OR TS=spermatogenesis OR TS=testosterone OR TS=spermatogonia OR TS=spermatogonias OR TS=spermatocyte OR TS=spermatocytes OR TS=spermatid OR TS=spermatids OR TS=leydig cells OR TS=seminiferous tubules OR TS=blood-testis barrier OR TS=seminiferous epithelium OR TS=Sertoli cells | TS=phytoestrogens OR TS=phytoestrogen OR TS=plant estrogen OR TS=estrogen, plant OR TS=plant estrogens OR TS=estrogens, plant OR TS=phyto-estrogen OR TS=phyto- estrogen OR TS=estrogen-like plant extracts OR TS=estrogen like plant extracts OR TS=extracts, estrogen-like plant OR TS=plant extracts, estrogen-like OR TS=androgen antagonists OR TS=isoflafone OR TS=isoflavones OR TS=isoflavone derivatives OR TS=derivatives, isoflavone OR TS=genistein OR TS=daidzein OR TS=glycine OR TS=formononetine OR TS=biocanin A OR TS=equol |

## CAPÍTULO 2

### **Efeitos das Bebidas Lácteas de Soja com Grãos não Transgênicos, Transgênicos e Leite de Vaca sobre os Testículos de Camundongos Balb C Adultos**

**Amanda Alves Lozi<sup>1</sup>, Diane Costa Araujo<sup>1</sup>, Franciele de Fatima Viana Santana, Patrícia da Silva Mattozinhos<sup>1</sup>, Mariáurea Matias Sarandy<sup>1</sup>, Reggiani Vilela Gonçalves<sup>2</sup>, Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo<sup>2</sup> and Sérgio Luis Pinto da Matta<sup>1</sup>**

*1-Department of General Biology, Federal University of Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil*

*2-Department of Animal Biology, Federal University of Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil*

#### **RESUMO**

As bebidas lácteas de soja, consumidas em grandes quantidades nos dias atuais, possuem em sua composição isoflavonas (30,02 mg/L a 63,6 mg/L), que são compostos orgânicos naturais, não esteroides e de origem vegetal, possuindo estrutura química e funcional semelhante à do estrogênio. No organismo as isoflavonas podem atuar como hormônios endógenos, causando desequilíbrio corpóreo. O sistema reprodutor masculino é regulado pela testosterona e qualquer alteração em sua concentração, pode levar a danos para a produção espermática. Não existem trabalhos na literatura avaliando os efeitos das bebidas lácteas de soja no sistema reprodutor masculino. Sabendo disto, o objetivo desse estudo, foi avaliar os efeitos das bebidas lácteas (não transgênica e transgênica) de soja e leite de vaca sobre os testículos de camundongos Balb C adultos, durante 42 dias. Foram utilizados 24 camundongos Balb C machos, adultos, divididos em quatro grupos experimentais (n = 6 animais/grupo). O grupo 1 controle recebeu água destilada, o grupo 2 recebeu bebida láctea de soja com grãos não transgênicos, o grupo 3 recebeu bebida láctea de soja com grãos transgênicos e o grupo 4 recebeu Leite de vaca, por gavagem, todos na dose de 0,7 mL. Ao final do tratamento (43º dia), os animais foram pesados, anestesiados e eutanasiados. Os testículos foram removidos, dissecados e pesados, o testículo esquerdo foi fixado para análises histomorfométricas e o direito congelado para análise do estado oxidativo. O peso corporal reduziu apenas nos animais tratados com as bebidas lácteas de soja, quando comparados ao controle. Embora os compostos administrados não tenham alterado os níveis séricos de testosterona, o tratamento com a bebida láctea de soja com grãos transgênicos reduziu o diâmetro nuclear, volume da célula, do núcleo e do citoplasma de Leydig, em relação ao controle. Ainda, o tratamento com leite de vaca resultou em alterações histológicas testiculares, caracterizados como diminuição da altura e da área do epitélio seminífero, do percentual de vasos sanguíneos e do espaço linfático e aumento do diâmetro e

da área do lume tubular, comparado com o controle. Os compostos utilizados não causaram alterações nos demais parâmetros avaliados. Nossos resultados revelam que o tratamento com as bebidas lácteas de soja e com o leite de vaca, durante um ciclo espermatogênico, resultam em alterações testiculares. O consumo desses compostos por um período maior pode resultar em maiores prejuízos morfológicos nos testículos, podendo levar a alterações funcionais.

Palavras-chave: Isoflavonas. Desreguladores endócrinos. Reprodução. Machos.

### **ABSTRACT**

Soy milk drinks, consumed in large quantities nowadays, have isoflavones in their composition (30.02 mg/L to 63.6 mg/L), which are natural organic compounds, non-steroidal and of vegetable origin, having a structure chemically and functionally similar to estrogen. In the body, isoflavones can act as endogenous hormones, causing body imbalance. The male reproductive system is regulated by testosterone and any alteration in its concentration can lead to damage to sperm production. There are no studies in the literature evaluating the effects of soy milk drinks on the male reproductive system. Knowing this, the objective of this study was to evaluate the effects of dairy drinks (non-transgenic and transgenic) of soy and cow's milk on the testes of adult Balb C mice, for 42 days. Twenty-four adult male Balb C mice were divided into four experimental groups (n = 6 animals/group). Control group 1 received distilled water, group 2 received soy milk drink with non-transgenic grains, group 3 received soy milk drink with transgenic grains, and group 4 received cow's milk, by gavage, all at a dose of 0.7 mL. At the end of the treatment (43rd day), the animals were weighed, anesthetized, and euthanized. The testes were removed, dissected, and weighed, the left testicle was fixed for histomorphometric analysis and the right was frozen for analysis of the oxidative state. Body weight reduced only in animals treated with soy milk drinks when compared to the control. Although the administered compounds did not alter serum testosterone levels, treatment with soy milk drink with transgenic grains reduced nuclear diameter, cell volume, nucleus, and Leydig cytoplasm, in relation to the control. Furthermore, treatment with cow's milk resulted in testicular histological changes, characterized as a decrease in the height and area of the seminiferous epithelium, in the percentage of blood vessels and lymphatic space, and an increase in the diameter and area of the tubular lumen, compared to the control. The compounds used did not cause changes in the other evaluated parameters. Our results reveal that treatment

with soy milk drinks and cow's milk during a spermatogenic cycle results in testicular alterations. The consumption of these compounds for a longer period may result in greater morphological damage to the testes, which may lead to functional changes.

Keywords: Isoflavones. Endocrine disruptors. Reproduction. Males.

## 1. INTRODUÇÃO

As bebidas lácteas de soja, consumidas em grandes quantidades nos dias atuais, possuem altas concentrações de isoflavonas, variando de 30,02 mg/L a 63,6 mg/L (Setchell e Cole, 2003). As isoflavonas (genisteína, daidzeína, formononetina, biocanina A e equol), são compostos orgânicos naturais, não esteroides, de origem vegetal, presentes principalmente na família Fabaceae (Strauss *et al.*, 1998). São denominados fitoestrógenos, possuindo estrutura química e funcional semelhante à do estradiol (Strauss *et al.*, 1998; křížová *et al.*, 2019). Quando absorvidos pelos seres vivos conseguem se ligar a receptores específicos de estrógenos endógenos (Navarro, 2005), o que gera benefícios relatados em fêmeas, pela atuação semelhante aos hormônios femininos (Bu *et al.*, 2005, Medigović *et al.*, 2015; křížová *et al.*, 2019), e também em machos, na prevenção do câncer de próstata (Strom *et al.*, 1999; McCormick *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2007), sendo uma das vias, a diminuição na produção da testosterona (T). Visto que em machos, os efeitos positivos ocasionados pelo consumo de fitoestrógenos ocorre devido à diminuição da T, hormônio essencial para o funcionamento da espermatogênese, entende-se que essa alteração pode gerar danos nas funções testiculares, levando à infertilidade (Srilatha e Adaikan, 2003). Os efeitos terapêuticos atribuídos às isoflavonas têm contribuído para o aumento mundial do consumo de alimentos ricos em isoflavonas (Branca e Lorenzetti, 2005). No entanto, a disponibilidade de isoflavonas em cada tipo de alimento ou até mesmo dentro de um mesmo grupo sofre variações, dificultando assim o controle de consumo diário (Retana-Márquez *et al.*, 2012). As leguminosas (em destaque a soja), cereais integrais e algumas sementes presentes na dieta, possuem índices elevados de fitoestrógenos (Retana-Márquez *et al.*, 2012; křížová *et al.*, 2019). Outro alimento, também consumido em grandes quantidades pelos seres humanos, é o leite de vaca, podendo ter em sua constituição, isoflavonas (Flachowsky *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2021; Yenew *et al.*, 2022).

O leite de vaca, é uma fonte de nutrientes essenciais como cálcio e proteínas (Liu *et al.*, 2021; Yenew *et al.*, 2022), fornecendo suporte para várias funções do organismo (Renhe, 2008). Por ser uma fonte rica em nutrientes, crianças que não consomem leite de vaca apresentam falta de energia e diminuição nas taxas de cálcio, proteínas e lipídios (Medeiros *et*

*al.*,2004). A genisteína é o fitoestrógeno mais proeminente no leite de vaca, medido em concentrações de 58,9 a 89,8 µg/kg (Flachowsky *et al.*, 2011). Traços de equol, enterolactona, formononetina e daidzeína também são detectados no leite, principalmente, após a suplementação das vacas com farelo de soja em alta dosagem (Flachowsky *et al.*, 2011). O consumo de alimentos que possuem isoflavonas em altas concentrações, pode trazer danos para os órgãos reprodutivos masculinos (Srilatha e Adaikan, 2003).

Os testículos, são órgãos do sistema reprodutor masculino, responsáveis pela contínua produção de espermatozoides e da T, hormônio fundamental para manutenção da espermatogênese e das características sexuais secundárias (Russell e Griswold, 1993), e qualquer desequilíbrio na função testicular pode levar à infertilidade (Branca e Lorenzetti, 2005). Há estudos indicando que diversos compostos, como as isoflavonas conjugadas encontradas na soja, ou isoladas, como a genisteína, podem atuar como desreguladores endócrinos, levando a uma disfunção testicular (Branca e Lorenzetti, 2005, Navarro, 2005; Yildiz, 2005; křížová *et al.*, 2019). Quando absorvidas, as isoflavonas se ligam aos receptores de estrogênio (ER $\alpha$  e ER $\beta$ ) e desencadeiam as mesmas ações estrogênicas nos tecidos-alvo (Farmakalidis *et al.*, 1985, Navarro, 2005; Yildiz, 2005). Embora o efeito estrogênico desses fitoestrógenos seja muito fraco (Setchell *et al.*, 1997), eles podem exercer efeito agonístico e/ou antagonístico sobre os receptores de estrogênio (ER $\beta$ ) endógenos, por competirem pelos mesmos receptores (Folman e Pope, 1966).

As isoflavonas podem afetar a saúde reprodutiva masculina por alguns mecanismos, como a ação inibitória direta sobre os testículos, ou a alteração do eixo hipotálamo-hipófise, que promovem mudanças nas concentrações plasmáticas do hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) (Branca e Lorenzetti, 2005). A redução do LH pode prejudicar a função das células de Leydig, levando à diminuição da produção de T, enquanto a redução do FSH pode prejudicar a espermatogênese (Branca e Lorenzetti, 2005), pois interfere no funcionamento das células de Sertoli. Alterações morfofisiológicas nas gônadas, induzidas pela absorção de isoflavonas, podem afetar negativamente a realização de processos essenciais para a formação de gametas masculinos viáveis (Kreiger *et al.*, 1982; Chavarro *et al.*, 2008).

As isoflavonas têm vários efeitos na função sexual (Najaf e Ghazanfarpour, 2018). A genisteína, principal isoflavona da soja, pode causar efeitos positivos para a saúde reprodutiva feminina, como a reposição hormonal, tratamento e prevenção do câncer de mama (Cotroneo *et al.*, 2001; Bu *et al.*, 2005), sendo seus efeitos pouco conhecidos durante o desenvolvimento e funcionamento do sistema reprodutor masculino (Setchell, 1998; Jefferson *et al.*, 2005).

Apesar de esforços de pesquisa substanciais, as evidências sobre os efeitos das isoflavonas na saúde reprodutiva masculina são fragmentadas, apresentando até mesmo divergências entre as doses e compostos (conjugado ou isolado) utilizados (Lozi *et al.*, 2021). Vale salientar que não existem trabalhos que avaliam a ação do consumo de alimentos, como as bebidas lácteas de soja, que apresentam altos índices de isoflavonas sobre histologia testicular, sendo este trabalho pioneiro na avaliação dos efeitos no estado oxidativo e na histologia deste órgão.

A realização de pesquisas relacionadas à histologia testicular são de extrema importância, a fim de se verificar a eficácia e segurança do consumo diário de bebidas lácteas de soja e do leite de vaca, para a saúde reprodutiva masculina. Dessa maneira, este estudo objetivou-se avaliar o impacto do consumo de bebidas a base de soja (não transgênica e transgênica) e leite de vaca, nos testículos de camundongos Balb C, adultos, durante 42 dias. Nossas descobertas podem aumentar o conhecimento sobre os mecanismos de ação das isoflavonas da soja nos testículos, evidenciando seus efeitos durante o ciclo reprodutivo dos animais (42 dias), evitando o consumo em níveis prejudiciais à fertilidade masculina.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Animais**

Foram utilizados 24 camundongos Balb C adultos machos (36g e 50 dias de vida), obtidos do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram transportados em veículo com velocidade e temperatura controladas, sendo mantidos em período de adaptação por uma semana no Biotério Setorial do Departamento de Biologia Geral, onde o experimento foi realizado. Para definir o tamanho da amostra utilizamos o programa WinPepi, com um nível de significância de 5% e um grau de certeza de 10%, conferindo ao teste um poder de 90%. Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa, protocolo nº 01/2022.

### **2.2 Tratamento**

Os animais foram divididos, aleatoriamente, em quatro grupos experimentais (n = 6 animais/grupo). O grupo 1 (controle) recebeu água destilada, grupo 2 recebeu bebida láctea de soja com grãos não transgênicos, grupo 3 recebeu bebida láctea de soja com grãos transgênicos e grupo 4 recebeu leite de vaca, durante 42 dias, todos na dose de 0,7 mL, por gavagem. Os animais foram mantidos sob controle de luminosidade (12h claro/ 12h escuro) e temperatura (21°C ± 1) e receberam água e ração padrão *ad libitum*. A bebida láctea de soja com grãos não

transgênicos, transgênicos e o leite de vaca utilizadas foram de fabricação comercial, trocadas a cada três dias e mantidas sobre refrigeração durante todo o experimento. As tabelas nutricionais dos compostos utilizados estão representadas na Figura 1. O leite de vaca foi utilizado para comparação com as bebidas lácteas de soja, além de poderem possuir em sua constituição, isoflavonas da soja, devido a alimentação dos animais. A dose de 0,7 mL utilizada, foi baseada no valor máximo a ser administrado por gavagem para camundongos, levando em consideração o tamanho do seu estômago.

| A | <b>Informação Nutricional<br/>200ml (1 copo)</b> | <b>Quantidade por<br/>porção</b> | <b>%V.D.*</b> |
|---|--|----------------------------------|---------------|
|   | Valor Energético                                 | 69 kcal = 290 kJ                 | 3             |
|   | Carboidratos, dos quais:                         | 2,3 g                            | 1             |
|   | Açúcares, dos quais:                             | 0,9 g                            | **            |
|   | Lactose  | 0 g                              | **            |
|   | Proteínas  | 6,4 g                            | 9             |
|   | Gorduras totais, dos quais:                      | 3,6 g                            | 7             |
|   | Gorduras Saturadas                               | 0,7 g                            | 3             |
|   | Gorduras trans                                   | 0 g                              | **            |
|   | Gorduras Monoinsaturadas                         | 1,0 g                            | **            |
|   | Gorduras Poli-insaturadas                        | 1,7 g                            | **            |
|   | Colesterol                                       | 0 mg                             | **            |
|   | Fibra Alimentar                                  | 1,0 mg                           | 4             |
|   | Sódio  | 178 mg                           | 7             |
|   | Vitamina A                                       | 162 mcg                          | 27            |
|   | Vitamina D                                       | 2,8 mcg                          | 56            |
|   | Vitamina E                                       | 2,7 mg                           | 27            |
|   | Vitamina B6                                      | 0,22 mg                          | 17            |
|   | Ácido Fólico                                     | 36 mcg                           | 15            |
|   | Vitamina B12                                     | 1,2 mcg                          | 50            |
|   | Cálcio   | 264 mg                           | 26            |
|   | Zinco  | 1,1 mg                           | 16            |

| B | <b>Informação Nutricional<br/>200ml (1 copo)</b> | <b>Quantidade por<br/>porção</b> | <b>%V.D.*</b> |
|---|--|----------------------------------|---------------|
|   | Valor Energético                                 | 95 kcal = 399 <u>kJ</u>          | 5             |
|   | Carboidratos                                     | 12 g                             | 4             |
|   | Açúcares   | 12 g                             | **            |
|   | Lactose  | 0 g                              | **            |
|   | Proteínas  | 5,4 g                            | 7             |
|   | Gorduras Totais                                  | 2,9 g                            | 5             |
|   | Gorduras Saturadas                               | 1,7 g                            | 8             |
|   | Gorduras Trans                                   | 0                                | **            |
|   | Fibra alimentar                                  | 0,8 g                            | 4             |
|   | Sódio  | 95 mg                            | 4             |
|   | Cálcio   | 240 mg                           | 24            |

| C | <b>Informação Nutricional<br/>200ml (1 copo)</b> | <b>Quantidade por<br/>porção</b> | <b>%V.D.*</b> |
|---|--|----------------------------------|---------------|
|   | Valor energético                                 | 126 kcal = 529 <u>kJ</u>         | 6             |
|   | Carboidratos                                     | 10g                              | 3             |
|   | Proteínas  | 7,0g                             | 9             |
|   | Gorduras totais                                  | 6,4g                             | 12            |
|   | Gorduras saturadas                               | 4,0                              | 18            |
|   | Sódio  | 120 mg                           | 5             |
|   | Cálcio   | 240mg                            | 24            |

**Figura 1** – Bebidas lácteas de soja e leite de vaca utilizados para tratamento dos animais experimentais. A- Bebida láctea de soja com grãos não transgênicos (Ingredientes: Água, grãos de soja, minerais (cálcio e zinco), maltodextrina, sal, vitaminas (E, B6, A, ácido fólico, D e B12), aromatizante, estabilizantes: citrato de sódio, goma gelana e goma xantana, emulsificante lecitina de soja e edulcorante sucralose. B- Bebida láctea de soja com grãos transgênicos

(Ingredientes: Água, grãos de soja, açúcar, minerais (cálcio e zinco), sal, vitaminas (E, B6, A, ácido fólico, D e B12), aromatizante, estabilizantes: citrato de sódio, goma gelana e goma xantana, emulsificante lecitina de soja e edulcorante sucralose) C- Leite de vaca (Leite Pasteurizado Integral).

### **2.3 Coleta de amostras, biometria corporal e testicular**

Ao final do tratamento (43º dia), os animais foram pesados em balança de precisão 0,01g (AS500, Marte) e anestesiados com tiopental 30mg/kg pela via intraperitoneal. Posteriormente a anestesia foi aprofundada seguida da coleta do sangue por meio de punção cardíaca, sendo os animais eutanasiados por exsanguinação. O sangue foi centrifugado a 2000 rpm por 15 minutos a 4°C para obtenção do soro, o qual foi colocado em microtubos, congelados e armazenados em ultrafreezer a -80°C para análise da testosterona sérica. Em seguida, foi realizada uma abertura da cavidade abdominal a partir da incisão na linha alba, para dissecação e obtenção dos testículos.

Os testículos foram removidos, dissecados e pesados, sendo os testículos esquerdos fixados em solução Karnovsky (Karnovsky, 1965) para avaliação histológica, e os testículos direitos congelados em nitrogênio e armazenados ultrafreezer (-80 °C) para análise do estado oxidativo.

Para determinar o peso do parênquima testicular, a albugínea foi retirada do testículo previamente fixado e pesada, descontando-se seu peso daquele obtido para o testículo inteiro. Baseado nos pesos corporal e testicular foi calculado o Índice Gonadossomático (IGS) a partir da equação:  $IGS (\%) = PG / PC \times 100$ , onde PG = Peso total das Gônadas e PC = Peso Corporal (Amann, 1970). Baseado nos pesos do parênquima testicular e corporal foi calculado o Índice Parenquimossomático (IPS) a partir da equação:  $IPS (\%) = PPT / PC \times 100$ , onde PPT = Peso do Parênquima de 2 Testículos e PC = Peso Corporal.

### **2.4 Processamento do material histológico para microscopia de luz**

Fragmentos do testículo destinados ao estudo em microscopia de luz foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, incluídos em 2-hidroxietil metacrilato (Historesin®, Leica), seccionados em micrótomo rotativo Leica RM 2255 dotado de navalha de vidro (Leica, Wetzlar, Alemanha) na espessura de 3µm mantendo-se um intervalo de 13 cortes entre secções, e corados com azul de toluidina-borato de sódio 1%. As preparações foram montadas com Entellan® (Merck, Frankfurt, Alemanha). Imagens histológicas do parênquima foram obtidas em microscópio Olympus AX-70 e analisadas utilizando-se o *software* Image J ® versão 1.53a

(National Institutes of Health, Rockville, MD, EUA) de acordo com as regiões pré-definidas para as análises (Mouro *et al.*, 2019).

## **2.5 Histomorfometria testicular**

### *2.5.1 Diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero, diâmetro do lume, áreas de elementos tubulares e relação túbulo/epitélio*

O diâmetro tubular médio ( $\mu\text{m}$ ) por animal foi obtido a partir da mensuração, ao acaso, de 20 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentavam contorno mais circular possível, sem considerar o estágio em que se encontravam, o menor diâmetro observado em cada secção transversal, conforme recomendação de Berndtson *et al.* (1989). Nas mesmas secções utilizadas para medir o diâmetro tubular foi mensurada a altura do epitélio seminífero ( $\mu\text{m}$ ) a partir da túnica própria até o lume tubular. O valor encontrado para a altura do epitélio, em cada túbulo, representou a média de duas medidas diametralmente opostas. O diâmetro do lume foi obtido subtraindo-se o diâmetro tubular das duas alturas obtidas para o epitélio seminífero.

Para os cálculos das áreas tubular ( $\text{ArT}$ ), luminal ( $\text{ArL}$ ) e epitelial ( $\text{ArE}$ ) foram utilizadas as seguintes equações:  $\text{ArT} = \pi \cdot \text{RT}^2$ , onde  $\text{RT}$  = raio tubular;  $\text{ArL} = \pi \cdot \text{RL}^2$ , onde  $\text{RL}$  = raio luminal;  $\text{ArE} = \text{ArT} - \text{ArL}$ . A relação túbulo (T)/epitélio (E) foi obtida através da equação: Relação T/E =  $\text{ArT}/\text{ArE}$ .

### *2.5.2 Comprimento total dos túbulos seminíferos e comprimento total de túbulo por grama de testículo*

O comprimento total dos túbulos seminíferos, em metros, foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos mesmos nos testículos e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal, empregando-se a seguinte equação:  $\text{CTT} = \text{VTS}/\pi\text{R}^2$ , onde  $\text{VTS}$  = Volume total de túbulos seminíferos dos testículos,  $\pi\text{R}^2$  = Área da secção transversal dos túbulos seminíferos e  $\text{R}$  = diâmetro tubular/2.

O comprimento total de túbulo por grama de testículo foi calculado a partir da equação:  $\text{CTT/g} = \text{CTT} / \text{PG}$ , onde  $\text{CTT}$  = Comprimento total de túbulos seminíferos e  $\text{PG}$  = Peso das gônadas.

### 2.5.3 Volumetria dos componentes testiculares e índices tubulossomático, epiteliossomático e Leydigossomático.

A proporção volumétrica dos elementos que compõem o parênquima testicular foi estimada a partir da contagem de 5.320 pontos por animal, utilizando-se retículo com 266 intersecções (pontos), em aumento de 400x. Foi realizada a contagem de 20 campos aleatoriamente distribuídos nas preparações histológicas do testículo de cada animal. Foram anotados pontos sobre as estruturas do parênquima testicular como túbulo seminífero, especificando-se aqueles sobre a túnica própria, epitélio seminífero e lume, e sobre o compartimento intertubular. A proporção volumétrica desses componentes foi calculada utilizando-se a seguinte equação:  $\text{Proporção volumétrica (\%)} = (\text{NT} / \text{NTT}) \times 100$ , onde NT = Registro do número de pontos contados sobre o componente e NTT = Número de pontos totais contados sobre o parênquima testicular.

A proporção volumétrica entre os elementos que compõem o intertúbulo foi estimada a partir da contagem de 1.000 pontos por animal, utilizando-se retículo com 540 intersecções (pontos), em aumento de 400X, realizando-se a contagem de campos aleatoriamente distribuídos nas preparações histológicas do testículo de cada animal. Foram contados pontos sobre as células de Leydig, tanto núcleo como citoplasma, vasos sanguíneos, espaço linfático, macrófago e tecido conjuntivo, obtendo-se as proporções volumétricas entre estes por meio da equação:  $\text{Proporção volumétrica (\%)} = (\%IT \times \%PVI) / 100$ , onde %IT = Proporção volumétrica de intertúbulo no testículo e %PVI = Proporção volumétrica do componente no intertúbulo. Para o cálculo dos volumes dos elementos que compõem o túbulo e intertúbulo foi utilizada a equação:  $\text{Volume} = \% \text{ do elemento} \times \text{PPT} / 100$ , onde PPT = Peso do parênquima de 2 testículos.

Baseado no volume de túbulos seminíferos e no peso corporal foi calculado o índice tubulossomático (ITS) a partir da equação:  $\text{ITS} = \text{VTS} / \text{PC} \times 100$ , onde VTS = Volume de túbulo seminífero dos testículos e PC = Peso corporal. Baseado no volume de epitélio seminífero e no peso corporal foi calculado o índice epiteliossomático (IES) a partir da equação:  $\text{IES} = \text{VES} / \text{PC} \times 100$ , onde VES = Volume de epitélio seminífero dos testículos e PC = Peso corporal. Baseado no volume de células de Leydig e no peso corporal foi calculado o índice Leydigossomático a partir da equação:  $\text{ILS} = (\text{VCL} / \text{PC}) \times 100$ , onde VCL = Volume de células de Leydig nos testículos e PC = Peso corporal. O volume do testículo foi considerado igual ao peso uma vez que a densidade testicular está próxima de 1 em mamíferos (Johnson *et al.*, 1981).

#### 2.5.4 Contagem da população celular de túbulos no estágio I do ciclo do epitélio seminífero

A estimativa dos diferentes tipos celulares que compõem o epitélio germinativo no estágio I do ciclo do epitélio seminífero, classificado de acordo com o método da morfologia tubular (Roosen-Runge e Giesel, 1950; Roosen-Runge, 1955; Swierstra, 1968; Berndtson, 1977), foi feita a partir da contagem dos núcleos das células germinativas e de nucléolos das células de Sertoli. Foram contados núcleos de espermatogônias, espermatócitos I na fase de preleptóteno/leptóteno, espermatócitos I na fase de paquíteno, espermátides arredondadas e nucléolos evidentes de células de Sertoli em 20 secções transversais de túbulos para cada animal.

As contagens obtidas foram corrigidas para o diâmetro nuclear (DM) na espessura do corte histológico, utilizando-se a fórmula de Abercrombie (1946) modificada por Amann e Almquist (1962), sendo NCEI= número corrigido de células do estágio 1:

$$\text{NCEI} = \text{Contagem obtida} \times \frac{\text{Espessura do Corte}}{\text{Espessura do Corte} + \sqrt{\left[\frac{\text{DM}}{2}\right]^2 - \left[\frac{\text{DM}}{4}\right]^2}}$$

Foram medidos os diâmetros de 30 núcleos dos tipos celulares estudados, para cada animal, em aumento de 400x. Para a espermatogônia, que apresenta núcleo ovoide, o valor utilizado foi aquele obtido pela média entre o diâmetro nuclear maior e menor. Como o núcleo da célula de Sertoli é irregular, foi medido o seu nucléolo. O número de células de Sertoli foi corrigido para o diâmetro nucleolar e espessura do corte histológico. Assim, foram contabilizadas exclusivamente células de Sertoli com nucléolo visível, o que proporcionou aplicação da mesma fórmula citada anteriormente.

#### 2.5.5 Razões entre os números celulares

Para a avaliação da eficiência do processo espermatogênico e das células de Sertoli, foram estimadas as razões entre os números corrigidos de células da linhagem espermatogênica e entre estes números e o número de células de Sertoli no estágio I do ciclo do epitélio seminífero. As seguintes razões foram utilizadas:

- Espermatócitos primários (em preleptóteno/leptóteno) / espermatogônias, obtendo-se o coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais;
- Espermátides arredondadas / espermatogônias, obtendo-se o rendimento geral da espermatogênese;

- Espermátides arredondadas / espermátocitos primários (em paquíteno), obtendo-se o índice meiótico;
- Espermátides arredondadas / nucléolo de células de Sertoli, obtendo-se o índice de célula de Sertoli que mede a eficiência desta célula;
- Número total corrigido de células germinativas / nucléolo de células de Sertoli, obtendo-se a capacidade total de suporte da célula de Sertoli.

#### *2.5.6 Número de células de Sertoli por testículo e por grama de testículo*

A estimativa do número de células de Sertoli por testículo (CST) foi realizada a partir do número corrigido de nucléolos de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero no estágio I e do comprimento total de túbulos seminíferos por testículo, de acordo com a equação:  $CST = (CTT/T \times SER) / EC$ , onde CTT/T = Comprimento total de túbulo por testículo, SER = Número corrigido de nucléolos de Sertoli por secção transversal e EC = Espessura do corte. O número de células de Sertoli por grama de testículo (CS/gT) foi calculado a partir da equação:  $CST/gT = CST / PT$ , onde PT = Peso testicular.

#### *2.5.7 Produção espermática diária por testículo e por grama de testículo*

A produção espermática diária (PED) por testículo foi estimada de acordo com a equação desenvolvida por Amann (1970):  $PED = (VTS \times EAR) / (DC \times AST \times EC)$ , onde: VTS = Volume total de túbulos seminíferos ( $\mu\text{m}^3$ ), EAR = Número corrigido de espermátides arredondadas, DC = Duração do ciclo do epitélio seminífero (dias), AST = Área da secção transversal do túbulo seminífero ( $\mu\text{m}^2$ ) e EC = Espessura do corte histológico ( $\mu\text{m}$ ). A produção espermática diária por grama de testículo (PED/g) foi obtida a partir da fórmula:  $PED/gT = PED / PT$ , onde PT = peso testicular. A duração do ciclo do epitélio seminífero em camundongos é de nove dias (Russell *et al.*, 1990), sendo uma constante biológica espécie-específica.

#### *2.5.8 Diâmetro nuclear, volumes nuclear, citoplasmático e de uma célula de Leydig e número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo*

Foi mensurado o diâmetro nuclear médio ( $\mu\text{m}$ ) das células de Leydig em aumento de 400x, totalizando 30 núcleos para cada animal. Os núcleos medidos foram aqueles que se apresentaram esféricos, com cromatina perinuclear e nucléolos evidentes. A partir das fórmulas abaixo, foram calculados o volume nuclear (VNL), citoplasmático (VCL) e, conseqüentemente,

o volume de cada célula de Leydig (VL), em  $\mu\text{m}^3$ :  $VNL = 4/3 \pi R^3$ , onde R = Raio nuclear;  $VCL = \%CL \times VNL / \%NL$ , onde  $\%CL$  = Proporção volumétrica de citoplasma de Leydig no intertúbulo e  $\%NL$  = Proporção volumétrica de núcleo de Leydig no intertúbulo. O volume de uma célula de Leydig foi obtido através da fórmula  $VL = VNL + VLC$ .

O volume que a célula de Leydig ocupa nos testículos (VLT), em  $\mu\text{L}$ , foi calculado a partir da fórmula:  $VLT = (\%Ley \times PPT) / 100$ , onde  $\%Ley$  = Proporção volumétrica da célula de Leydig no parênquima testicular e PPT= Peso do parênquima dos testículos. O volume que a célula de Leydig ocupa por grama de testículo (VL/gT), em  $\mu\text{L}$ , foi calculado a partir da fórmula:  $VL/gT = VLT / PT$ , onde VLT = Volume que a célula de Leydig ocupa nos testículos, e PT= peso dos testículos.

De posse do volume individual da célula de Leydig e do volume total ocupado por estas células nos testículos, foram calculados o número de células de Leydig nos testículos (NL) e por grama de testículo (NLg/T), por meio da seguinte equação:  $NL = VLT / VL$ , onde: VLT = Volume de Leydig nos testículos e VL = Volume de uma célula de Leydig;  $NLg/T = NL / PT$ , onde PT = Peso dos Testículos.

## 2.6 Determinação da concentração de testosterona

No momento da eutanásia o sangue foi coletado por punção cardíaca e centrifugado a 2000 rpm por 15 minutos a 4°C, o soro obtido foi congelado (-80 °C) e posteriormente processado para quantificação da testosterona sérica. A quantificação foi obtida por ensaio de quimioluminescência usando o kit Access® Testosterone, adequado para o Sistema de Imunoensaio Access III (Beckman Coulter, Brea, CA) e os resultados foram expressos em ng/dL.

## 2.7 Histopatologia testicular

Para a avaliação histopatológica do testículo foram contados 200 túbulos aleatórios por animal. De acordo com Johnsen (1970), há 10 níveis de alterações que são expressos em números. No presente trabalho foi utilizado o escore de Johnsen modificado (Mouro *et al.*, 2019) para 8 níveis: Nível 1- túbulos íntegros, com células germinativas dispostas no seu sítio de localização normal e poucos vacúolos; Nível 2- espaços vacuolares na base do epitélio; Nível 3- espaços vacuolares no ápice do epitélio; Nível 4- espaços vacuolares na base e no ápice do epitélio; Nível 5- células espermatogênicas no interior do lume e presença de células em processo de degeneração visível ; Nível 6- túbulos apenas com células basais; Nível 7- túbulos

apenas com células de Sertoli; Nível 8- túbulos seminíferos desprovidos de células de Sertoli ou germinativas, caracterizando um estado irreversível de degeneração. Esses níveis foram agrupados em normal (nível 1), patologias leves (Níveis 2 e 3), moderadas (Níveis 4 e 5) e severas (Níveis 6, 7 e 8).

## 2.8 Análise antioxidante (Sequestro por DPPH)

Para avaliar a capacidade antioxidante das bebidas lácteas de soja com grãos não transgênicos, transgênicos e do leite de vaca, foi utilizada a técnica do sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), metodologia descrita por Falcão *et al.*, (2006). A análise é feita medindo a capacidade inibitória de compostos quanto à ação de radicais livres, através do decréscimo da absorbância do meio de reação (Kim *et al.*, 2002). A atividade antioxidante é avaliada pela redução do radical DPPH formando difinenil-picril-hidrazina, um composto de coloração amarelada em uma reação que é estabilizada após 30 minutos do seu início (Brand-Williams *et al.*, 1995). Uma curva-padrão de absorbância de DPPH foi realizada e outra para padrão/controle. Para atividade antioxidante utilizou-se butilhidroxitolueno (BHT), ácido ascórbico (vitamina C) e rutina nas concentrações de 200, 175, 150, 125, 100, 75 e 50 µg/ml, diluídos em metanol. A cada concentração das beidas lácteas de soja e do leite de vaca (200 µL) ou de BHT/vitaminaC/rutina acrescentou-se 180 µL de DPPH, fazendo a leitura em leitor de microplaca a 517 nm, imediatamente após a mistura (Tempo 0) e após 30 minutos (Tempo 30) de reação. A porcentagem de inibição dos radicais DPPH foi calculada através da formula abaixo:

$$\text{Inibição do DPPH (\%)} = \frac{\text{Abs DPPH/metanol 80\%} - \text{Abs compostos}}{\text{Abs DPPH/metanol 80\%}} \times 100$$

A solução de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8- tetrametil-2-ácido carboxílico) em diferentes concentrações, foi utilizada como curva padrão, sendo os resultados expressos em µmoles (equivalentes de Trolox/200 mL de amostra). Todas as amostras testadas foram feitas em triplicatas.

## 2.9 Avaliação do estado oxidativo

O testículo foi homogeneizado em tampão fosfato (pH 7,4) na proporção de 100 mg de órgão para 1000µL. A suspensão foi centrifugada (12000 rpm a 4°C por 10 minutos) e o sobrenadante foi utilizado nas análises de determinação da atividade de enzimas antioxidantes,

concentração de óxido nítrico, malondialdeído e proteína total. Todas as análises foram feitas e triplicatas.

### 2.9.1 Quantificação das enzimas antioxidantes

A atividade enzimática da Catalase (CAT) foi mensurada segundo Aebi *et al.* (1984) pela taxa de queda da absorbância em 60 segundos do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (10 mM) em tampão fosfato de potássio 0,2 M (pH 7,0) e homogenato de tecido em espectrofotômetro ( $\lambda = 240\text{nm}$ ). Foi utilizado o coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio e  $240 = 36 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$  e os resultados foram expressos em U CAT/mg proteína.

A atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD) foi determinada em leitor de Elisa em 570 nm baseada na capacidade dessa enzima em catalisar a reação do superóxido  $\text{O}_2^-$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  e, assim, diminuir a razão de auto-oxidação do pirogalol (Dieterich *et al.*, 2000). Os resultados foram expressos em U SOD/mg proteína.

A atividade enzimática da Glutathione S-Transferase (GST) foi mensurada de acordo com Habig *et al.* (1974), através da formação do conjugado glutathione-2, 4-dinitrobenzeno (CDNB). A atividade da enzima foi estimada em uma mistura contendo CDNB 1 mM em etanol, Glutathione Redutase (GSH) 1 mM, fosfato de potássio (pH 7,0) 100 mM e homogenato de tecido pelo aumento da absorbância ( $\lambda = 340 \text{ nm}$ ) por 90 segundos. O coeficiente de extinção molar do CDNB e  $340 = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  foi utilizado para os cálculos e os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ . A proteína total dos sobrenadantes de SOD, CAT e MDA foi mensurada (Lowry *et al.*, 1951) utilizando-se albumina de soro bovino como padrão, e foi utilizada para a homogeneização dos dados do estresse oxidativo.

### 2.9.2 Determinação do subproduto da peroxidação lipídica – Malondialdeído (MDA)

Ao homogenato foi adicionado solução TBARS (ácido tricloroacético 15%, 0,375% de ácido tiobarbitúrico e ácido clorídrico 0,25 M), pois as substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico são, em sua maioria, produtos da peroxidação lipídica, sendo o MDA importante marcador para monitorar a taxa de lipoperoxidação. Posteriormente foi aquecido em água fervente por 40 minutos a  $90^\circ\text{C}$ , resfriado, adicionado álcool butílico (600mL), agitado em vortex e centrifugado a 6000 rpm. A fase superior foi utilizada para quantificar a concentração de MDA em leitor de microplacas ( $\lambda = 532\text{nm}$ ). A concentração de MDA foi determinada por meio de curva padrão a partir de concentrações conhecidas de 1, 1, 3,3-tetramethoxypropane (TMPO). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}/\text{mg}$  proteína (Buege e Aust, 1978).

### 2.9.3 Óxido nítrico (NO)

O nitrito usado como indicador da síntese de óxido nítrico é detectado pelo Reativo de Griess, composto por 1% de sulfanilamida e 0,1% naftil-etileno-diamina em ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) a 2,5%. Desta forma, 50µL do sobrenadante das amostras foi adicionado em microplacas com igual volume do Reativo de Griess e incubado em temperatura ambiente por 15 minutos, e em seguida foi realizada a leitura em leitor de microplacas ( $\lambda = 540$  nm). A concentração do óxido nítrico das amostras foi determinada utilizando curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio e expressa em µM (Droge, 2002; Ricart-Jané *et al.*, 2002).

### 2.10 Análises estatísticas

Os parâmetros foram submetidos à avaliação de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e, em seguida, foi feita análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman-Keuls (SNK). Foi utilizado o software STATISTICA, sendo o nível de significância considerado de  $p \leq 0,05$ . Todos os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Biometria corporal e testicular

Os parâmetros biométricos corporal e testicular estão descritos na Tabela 1. Houve diminuição do peso corporal dos animais tratados com a bebida láctea de soja com grãos não transgênicos e transgênicos, quando comparados ao controle. O peso testicular e do parênquima não sofreram alterações significativas quando comparados ao controle. Além disso, também não foram observadas alterações significativas nos índices parenquimossomático e gonadossomático em nenhum dos grupos tratados, em relação ao controle. O peso da albugínea diminuiu significativamente nos grupos tratados com a bebida láctea de soja com grãos não transgênicos e leite de vaca em relação ao grupo controle.

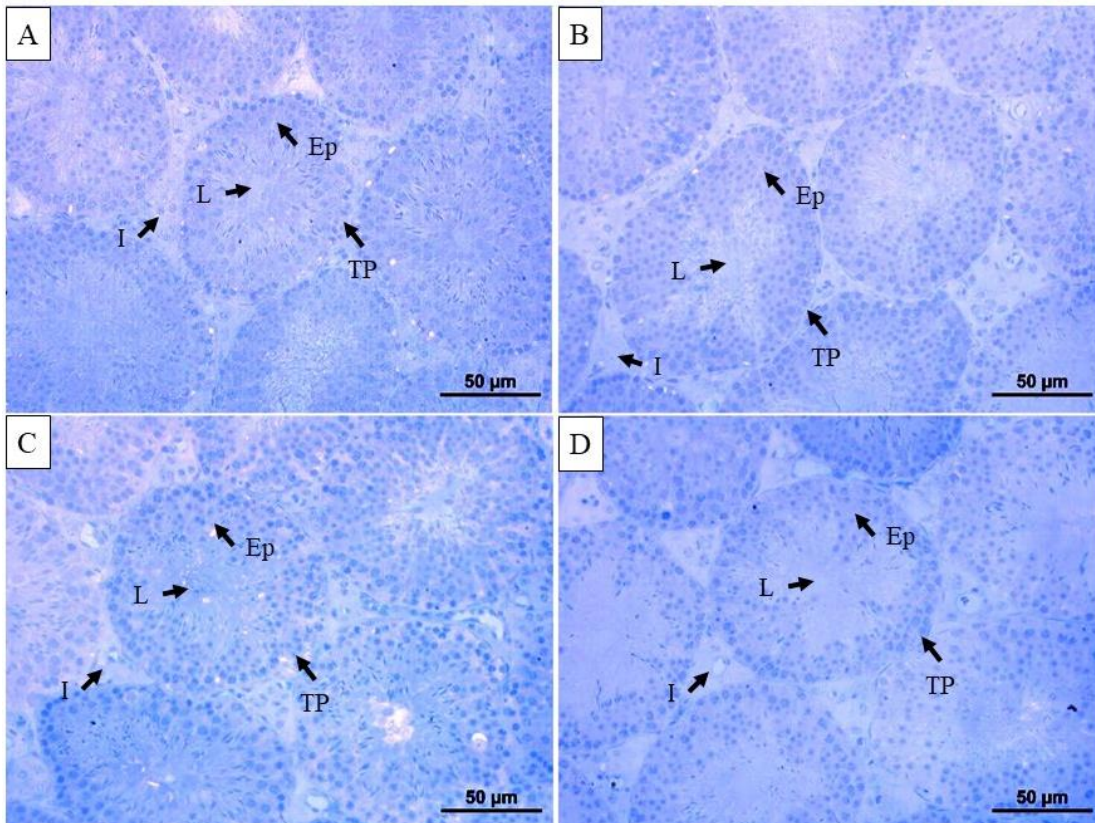
**Tabela 1** - Parâmetros biométricos corporal e testicular, de camundongos Balb C, adultos, expostos a bebidas lácteas de soja com grãos não transgênicos (NT) e transgênicos (T), e leite de vaca, durante 42 dias.

| Parâmetros             | Controle                  | Bebida Láctea de Soja (NT) | Bebida Láctea de Soja (T) | Leite de Vaca              |
|------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Peso corporal (g)      | 36,17 ± 2,89 <sup>a</sup> | 32,14 ± 2,60 <sup>b</sup>  | 32,12 ± 3,03 <sup>b</sup> | 35,49 ± 2,22 <sup>ab</sup> |
| Peso testicular (g)    | 0,20 ± 0,02               | 0,20 ± 0,02                | 0,18 ± 0,03               | 0,20 ± 0,02                |
| Peso da albugínea (g)  | 0,02 ± 0,01 <sup>a</sup>  | 0,01 ± 0,00 <sup>b</sup>   | 0,02 ± 0,00 <sup>ab</sup> | 0,01 ± 0,00 <sup>b</sup>   |
| Peso do parênquima (g) | 0,17 ± 0,01               | 0,15 ± 0,03                | 0,17 ± 0,03               | 0,18 ± 0,03                |
| IGS (%)                | 0,54 ± 0,06               | 0,49 ± 0,09                | 0,58 ± 0,06               | 0,57 ± 0,06                |
| IPS (%)                | 0,48 ± 0,06               | 0,47 ± 0,08                | 0,53 ± 0,06               | 0,55 ± 0,07                |

Percentual dos índices Gonadossomático (IGS) e Parenquimossomático (IPS). Dose única diária, exposição crônica (n = 6). Dados expressos como média ± DP. Letras diferentes, mostram valores significativamente diferentes na mesma linha, em relação ao controle ( $p \leq 0,05$ ) (Student Newman Keuls).

### 3.2 Histomorfometria tubular

Os elementos observados na análise da microestrutura tubular como lume (L), epitélio seminífero (Ep) e túnica própria (TP), estão representados na Figura 2. Os parâmetros diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero, áreas de elementos tubulares, comprimento total dos túbulos seminíferos por testículo e por grama de testículo, bem como a relação túbulo/epitélio, estão descritas na Tabela 2. O diâmetro de túbulo, comprimento total dos túbulos seminíferos por testículo e por grama de testículo, área do túbulo e a relação túbulo/epitélio não sofreram alterações significativas quando comparadas ao controle. A altura e a área de epitélio diminuíram significativamente apenas no grupo tratado com leite de vaca. Além disso, também foi observado aumento significativo no diâmetro e na área de lume apenas no grupo tratado com leite de vaca.



**Figura 2** – Fotomicrografia do parênquima testicular de camundongos Balb C, adultos, expostos a bebidas lácteas de soja com grãos não transgênicos (NT) e transgênicos (T), e leite de vaca, durante 42 dias. A- Grupo controle, B- Grupo bebida láctea de soja com grãos não transgênicos. C- Grupo bebida láctea de soja com grãos transgênicos e D- Grupo leite de vaca. L – Lume; Ep - Epitélio seminífero; TP - Túnica Própria. Corte de 3 μm corado com azul de toluidina. Barras = 50μm.

**Tabela 2** - Parâmetros morfométricos testiculares da região tubular de camundongos Balb C, adultos, expostos a bebidas lácteas de soja com grãos não transgênicos (NT) e transgênicos (T), e leite de vaca, durante 42 dias.

| Parâmetros                                       | Controle                       | Bebida Láctea de Soja (NT)     | Bebida Láctea de Soja (T)      | Leite de Vaca                 |
|--|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| DT ( $\mu\text{m}$ )                             | 102,83 $\pm$ 6,88              | 106,68 $\pm$ 11,18             | 100,84 $\pm$ 7,41              | 99,03 $\pm$ 5,91              |
| AE ( $\mu\text{m}$ )                             | 37,17 $\pm$ 5,02 <sup>a</sup>  | 33,51 $\pm$ 4,25 <sup>ab</sup> | 31,53 $\pm$ 4,83 <sup>ab</sup> | 26,85 $\pm$ 2,41 <sup>b</sup> |
| DL ( $\mu\text{m}$ )                             | 28,50 $\pm$ 10,97 <sup>a</sup> | 39,66 $\pm$ 6,67 <sup>ab</sup> | 37,79 $\pm$ 5,26 <sup>ab</sup> | 45,34 $\pm$ 6,93 <sup>b</sup> |
| CTS/t (m)  | 18,97 $\pm$ 2,43               | 15,05 $\pm$ 3,45               | 19,25 $\pm$ 4,60               | 22,93 $\pm$ 4,12              |
| CTS/gt (m/g)                                     | 99,01 $\pm$ 18,20              | 95,98 $\pm$ 19,84              | 101,99 $\pm$ 15,96             | 112,94 $\pm$ 11,56            |
| Área do túbulo ( $\mu\text{m}^2 \times 10^4$ )   | 0,84 $\pm$ 0,11                | 0,90 $\pm$ 0,19                | 0,80 $\pm$ 0,12                | 0,77 $\pm$ 0,09               |
| Área do epitélio ( $\mu\text{m}^2 \times 10^4$ ) | 0,76 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>   | 0,78 $\pm$ 0,17 <sup>ab</sup>  | 0,69 $\pm$ 0,12 <sup>ab</sup>  | 0,61 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>  |
| Área do lume ( $\mu\text{m}^2 \times 10^4$ )     | 0,07 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>   | 0,13 $\pm$ 0,05 <sup>ab</sup>  | 0,11 $\pm$ 0,03 <sup>ab</sup>  | 0,17 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>  |
| RTE  | 1,19 $\pm$ 0,06                | 1,17 $\pm$ 0,05                | 1,17 $\pm$ 0,06                | 1,27 $\pm$ 0,08               |

DT – Diâmetro de túbulo; AE- Altura do epitélio seminífero; DL- Diâmetro do lume tubular; CTS/t- Comprimento total de túbulo seminífero por testículo; CTS/gt- Comprimento total de túbulo seminífero por grama de testículo e RTE – Relação túbulo/epitélio. Dose única diária, exposição crônica (n = 6). Dados expressos como média  $\pm$  DP. Letras diferentes, mostram valores significativamente diferentes na mesma linha, em relação ao controle ( $p \leq 0,05$ ) (Student Newman Keuls).

O percentual e volume dos componentes tubulares estão descritos na Tabela 3. Não houve alterações significativas quanto ao percentual e volume do túbulo seminífero, epitélio seminífero, túnica própria e lume nos grupos tratados, quando comparados ao controle. Além disso, nenhuma alteração nos índices tubulossomático e epiteliossomático foram encontradas em relação ao controle.

**Tabela 3** – Percentual e volume dos componentes tubulares de camundongos Balb C, adultos, expostos a bebidas lácteas de soja com grãos não transgênicos (NT) e transgênicos (T), e leite de vaca, durante 42 dias.

| Parâmetros | Controle     | Bebida Láctea de Soja (NT) | Bebida Láctea de Soja (T) | Leite de Vaca |
|------------|--------------|----------------------------|---------------------------|---------------|
| T (%)      | 90,06 ± 1,35 | 88,07 ± 1,69               | 89,24 ± 2,46              | 90,77 ± 2,89  |
| E (%)      | 78,73 ± 1,91 | 77,66 ± 2,16               | 78,44 ± 2,25              | 79,65 ± 2,66  |
| TP (%)     | 5,52 ± 0,85  | 5,28 ± 0,46                | 5,86 ± 0,81               | 6,17 ± 0,58   |
| L (%)      | 5,82 ± 1,03  | 5,14 ± 0,65                | 4,93 ± 1,07               | 4,95 ± 1,47   |
| VT (mL)    | 0,16 ± 0,01  | 0,14 ± 0,03                | 0,15 ± 0,03               | 0,18 ± 0,03   |
| VE (mL)    | 0,14 ± 0,01  | 0,12 ± 0,03                | 0,13 ± 0,03               | 0,16 ± 0,03   |
| VTP (mL)   | 0,01 ± 0,00  | 0,01 ± 0,00                | 0,01 ± 0,00               | 0,01 ± 0,00   |
| VL (mL)    | 0,01 ± 0,00  | 0,01 ± 0,00                | 0,01 ± 0,00               | 0,01 ± 0,00   |
| ITS (%)    | 0,43 ± 0,05  | 0,41 ± 0,08                | 0,47 ± 0,06               | 0,50 ± 0,07   |
| IES (%)    | 0,38 ± 0,04  | 0,37 ± 0,07                | 0,41 ± 0,05               | 0,44 ± 0,06   |

T–Túbulo Seminífero; E - Epitélio Seminífero; TP –Túnica Própria; L - Lume, VT - Volume de Túbulo Seminífero; VE - Volume de Epitélio Seminífero; VTP - Volume de Túnica Própria; VL - Volume de Lume; ITS - Índice Tubulossomático; IES - Índice Epiteliossomático. Dose única diária, exposição crônica (n = 6). Dados expressos como média ± DP. Letras diferentes, mostram valores significativamente diferentes na mesma linha, em relação ao controle ( $p \leq 0,05$ ) (Student Newman Keuls).

### 3.3 Contagem de células do estágio I

Os parâmetros referentes às análises feitas nos túbulos seminíferos no estágio I estão descritos na Tabela 4. O número corrigido das células germinativas do ciclo do epitélio seminífero, os índices espermáticos, o número de células de Sertoli e a produção espermática diária permaneceram inalterados em todos os grupos tratados quando comparados ao grupo controle.

**Tabela 4** - Número corrigido de células no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero, razões entre os tipos celulares, número de células de Sertoli e produção espermática diária de camundongos Balb C, adultos, expostos a bebidas lácteas de soja com grãos não transgênicos (NT) e transgênicos (T), e leite de vaca, durante 42 dias.

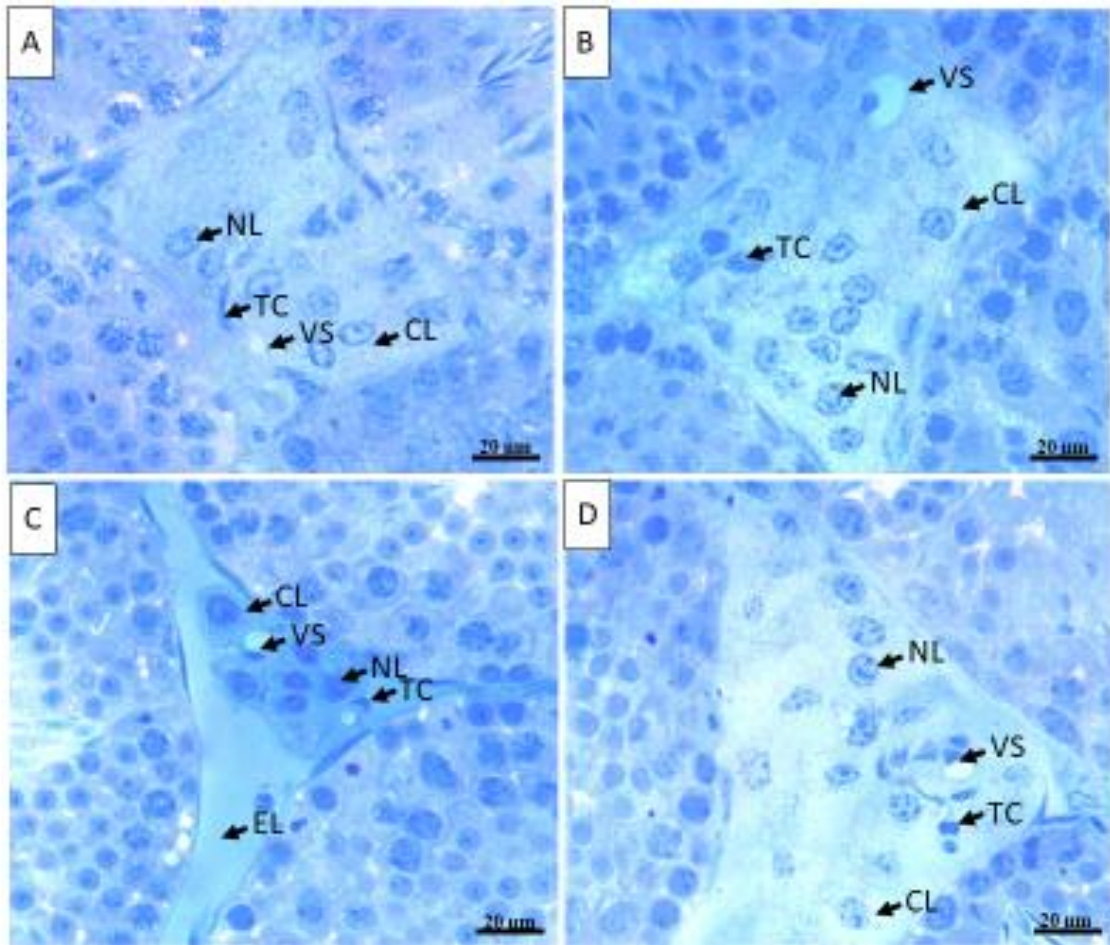
| Parâmetros                  | Controle       | Bebida Láctea de Soja (NT) | Bebida Láctea de Soja (T) | Leite de Vaca |
|-----------------------------|----------------|----------------------------|---------------------------|---------------|
| Espermatogônia A (%)        | 2,07 ± 0,51    | 2,02 ± 0,54                | 1,90 ± 0,49               | 2,40 ± 0,40   |
| Preleptóteno/Leptóteno (%)  | 51,24 ± 4,56   | 52,10 ± 3,61               | 55,26 ± 4,03              | 55,22 ± 2,54  |
| Paquíteno (%)               | 66,94 ± 7,03   | 80,00 ± 34,00              | 74,41 ± 9,50              | 81,76 ± 31,15 |
| Espermátide arredondada (%) | 127,10 ± 11,16 | 119,36 ± 10,50             | 129,22 ± 6,55             | 124,30 ± 5,92 |
| Célula de Sertoli (%)       | 7,36 ± 3,21    | 7,86 ± 0,94                | 9,36 ± 4,03               | 8,22 ± 1,18   |
| Índice mitótico             | 29,96 ± 8,12   | 29,74 ± 7,39               | 31,31 ± 6,62              | 22,04 ± 3,27  |
| Índice meiótico             | 2,34 ± 0,16    | 2,09 ± 0,42                | 2,12 ± 0,20               | 2,22 ± 0,52   |
| Índice de Célula de Sertoli | 13,09 ± 4,99   | 10,25 ± 2,21               | 11,17 ± 2,76              | 12,64 ± 1,28  |
| SER/t (x10 <sup>-5</sup> )  | 1,08 ± 0,40    | 1,34 ± 0,35                | 1,39 ± 0,37               | 1,37 ± 0,34   |
| SER/gt (x10 <sup>-5</sup> ) | 5,38 ± 2,26    | 6,01 ± 1,18                | 6,27 ± 2,11               | 6,23 ± 0,88   |
| CSS                         | 22,75 ± 7,71   | 21,85 ± 3,54               | 18,98 ± 4,01              | 20,62 ± 1,24  |
| RGE                         | 66,48 ± 11,68  | 73,21 ± 24,47              | 76,31 ± 21,32             | 68,34 ± 7,41  |
| PED/t (x10 <sup>6</sup> )   | 15,91 ± 2,49   | 16,72 ± 3,23               | 16,26 ± 1,31              | 17,33 ± 2,67  |
| PED/gt (x10 <sup>6</sup> )  | 72,76 ± 7,03   | 74,02 ± 9,11               | 69,83 ± 3,26              | 72,36 ± 10,08 |

SER/t – Número de célula de Sertoli por testículo; SER/gt – Número de célula de Sertoli por grama de testículo; CSS – Capacidade de suporte de Sertoli; RGE – Rendimento geral da espermatogênese; PED/t – Produção espermática diária por testículo; PED/gt – Produção espermática diária por grama de testículo. Dose única diária, exposição crônica (n = 6). Dados expressos como média ± DP. Letras diferentes, mostram valores significativamente diferentes na mesma linha, em relação ao controle (p ≤ 0,05) (Student Newman Keuls).

### 3.4 Histomorfometria intertubular

Os elementos observados na análise da microestrutura intertubular como o citoplasma da célula de Leydig (CL), vaso sanguíneo (VS), espaço linfático (EL), tecido conjuntivo (TC) e macrófago (M) estão representados na Figura 3. O percentual dos componentes do intertubulares estão descritos na Tabela 5.

O percentual de intertúbulo, de célula, citoplasma e núcleo de Leydig permaneceram inalterados em todos os grupos experimentais, assim como tecido conjuntivo e macrófagos, quando comparados ao grupo controle. O percentual de vasos sanguíneos e o espaço linfático reduziram apenas nos grupos tratados com leite de vaca.



**Figura 3** – Fotomicrografia da região intertubular dos testículos de camundongos Balb C, adultos, expostos a bebidas lácteas de soja com grãos não transgênicos (NT) e transgênicos (T), e leite de vaca, durante 42 dias. A- Grupo controle, B- Grupo bebida láctea de soja com grãos não transgênicos. C- Grupo bebida láctea de soja com grãos transgênicos e D- Grupo leite de vaca. CL- Célula de Leydig; VS- Vaso sanguíneo; EL- Espaço Linfático; Tecido Conjuntivo (TC). Corte de 3 µm corados com Azul de toluidina. Barras = 20µm.

**Tabela 5** – Percentual dos componentes do intertubulares de camundongos Balb C, adultos, expostos a bebidas lácteas de soja com grãos não transgênicos (NT) e transgênicos (T), e leite de vaca, durante 42 dias.

| Parâmetros               | Controle                 | Bebida Láctea de Soja (NT) | Bebida Láctea de Soja (T) | Leite de Vaca            |
|--------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|
| Intertúbulo (%)          | 9,94 ± 1,35              | 11,93 ± 1,69               | 10,76 ± 2,46              | 10,42 ± 2,89             |
| Célula de Leydig (%)     | 8,09 ± 1,45              | 10,37 ± 1,76               | 9,11 ± 2,38               | 9,23 ± 3,00              |
| Núcleo de Leydig (%)     | 2,41 ± 0,42              | 2,93 ± 0,66                | 2,47 ± 0,68               | 2,23 ± 0,55              |
| Citoplasma de Leydig (%) | 5,68 ± 1,14              | 7,44 ± 1,38                | 6,64 ± 1,73               | 7,00 ± 2,47              |
| Vaso sanguíneo (%)       | 0,52 ± 0,25 <sup>a</sup> | 0,48 ± 0,23 <sup>ab</sup>  | 0,33 ± 0,12 <sup>ab</sup> | 0,21 ± 0,10 <sup>b</sup> |
| Espaço Linfático (%)     | 0,77 ± 0,36 <sup>a</sup> | 0,60 ± 0,16 <sup>ab</sup>  | 0,99 ± 0,81 <sup>ab</sup> | 0,43 ± 0,28 <sup>b</sup> |
| Tecido Conjuntivo (%)    | 0,52 ± 0,37              | 0,45 ± 0,17                | 0,33 ± 0,16               | 0,55 ± 0,10              |
| Macrófago (%)            | 0,00 ± 0,01              | 0,02 ± 0,02                | 0,00 ± 0,01               | 0,00 ± 0,00              |

Dose única diária, exposição crônica (n = 6). Dados expressos como média ± DP. Letras diferentes, mostram valores significativamente diferentes na mesma linha, em relação ao controle (p ≤ 0,05) (Student Newman Keuls).

O volume dos componentes intertubulares estão descritos na Tabela 6. O volume de vasos sanguíneos reduziu apenas no grupo tratado com leite de vaca, quando comparado ao controle. O volume dos demais parâmetros avaliados como intertúbulo, célula, citoplasma e núcleo de Leydig, espaço linfático, tecido conjuntivo e macrófagos não tiveram alterações significativas em nenhum dos grupos tratados, quando comparados ao controle.

**Tabela 6** - Volume dos componentes intertubulares de camundongos Balb C, adultos, expostos a bebidas lácteas de soja com grãos não transgênicos (NT) e transgênicos (T), e leite de vaca, durante 42 dias.

| Parâmetros                | Controle                 | Bebida Láctea de Soja (NT) | Bebida Láctea de Soja (T) | Leite de Vaca            |
|---------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|
| Intertúbulo (µL)          | 17,26 ± 2,80             | 17,69 ± 2,96               | 17,69 ± 2,96              | 19,82 ± 3,60             |
| Leydig (µL)               | 14,02 ± 2,64             | 15,32 ± 2,32               | 15,32 ± 2,32              | 17,52 ± 4,42             |
| Núcleo de Leydig (µL)     | 4,19 ± 0,85              | 4,34 ± 0,96                | 4,34 ± 0,96               | 4,26 ± 0,77              |
| Citoplasma de Leydig (µL) | 9,83 ± 2,00              | 10,98 ± 1,70               | 10,98 ± 1,70              | 13,26 ± 3,71             |
| Vaso sanguíneo (µL)       | 0,92 ± 0,46 <sup>a</sup> | 0,69 ± 0,28 <sup>ab</sup>  | 0,69 ± 0,28 <sup>ab</sup> | 0,41 ± 0,20 <sup>b</sup> |
| Espaço Linfático (µL)     | 1,35 ± 0,68              | 0,94 ± 0,40                | 0,94 ± 0,40               | 0,84 ± 0,57              |
| Tecido Conjuntivo (µL)    | 0,90 ± 0,62              | 0,71 ± 0,43                | 0,71 ± 0,43               | 1,05 ± 0,12              |
| Macrófago (µL)            | 0,01 ± 0,01              | 0,03 ± 0,04                | 0,03 ± 0,04               | 0,00 ± 0,00              |

Dose única diária, exposição crônica (n = 6). Dados expressos como média ± DP. Letras diferentes, mostram valores significativamente diferentes na mesma linha, em relação ao controle (p ≤ 0,05) (Student Newman Keuls).

Os parâmetros morfométricos e estereológicos das células de Leydig estão descritos na Tabela 7. O volume e número de célula de Leydig por testículo e por grama de testículo, bem como o índice Leydigossomático permaneceram inalterados em todos os grupos tratados, quando comparados ao grupo controle. O diâmetro nuclear, volume da célula, do núcleo e do citoplasma de Leydig reduziram significativamente no grupo tratado com a bebida láctea de soja com grãos transgênicos, em relação ao grupo controle.

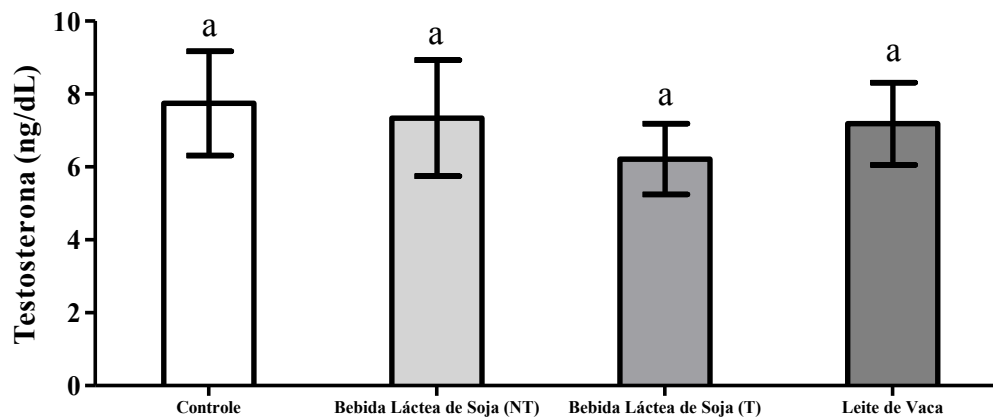
**Tabela 7** - Parâmetros morfométricos e estereológicos das células de Leydig de camundongos Balb C, adultos, expostos a bebidas lácteas de soja com grãos não transgênicos (NT) e transgênicos (T), e leite de vaca, durante 42 dias.

| Parâmetros                              | Controle                        | Bebida Láctea de Soja (NT)       | Bebida Láctea de Soja (T)       | Leite de Vaca                    |
|---|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| DNL ( $\mu\text{m}^3$ )                 | 4,51 $\pm$ 0,43 <sup>a</sup>    | 4,34 $\pm$ 0,36 <sup>ab</sup>    | 3,81 $\pm$ 0,48 <sup>b</sup>    | 3,97 $\pm$ 0,17 <sup>ab</sup>    |
| VCL ( $\mu\text{m}^3$ )                 | 167,21 $\pm$ 55,16 <sup>a</sup> | 156,86 $\pm$ 47,40 <sup>ab</sup> | 109,71 $\pm$ 37,14 <sup>b</sup> | 134,29 $\pm$ 19,70 <sup>ab</sup> |
| VL/t ( $\mu\text{m}^3$ ) $\times 10^9$  | 14,02 $\pm$ 2,64                | 15,32 $\pm$ 2,32                 | 15,05 $\pm$ 3,33                | 11,88 $\pm$ 2,10                 |
| VL/gt ( $\mu\text{m}^3$ ) $\times 10^9$ | 72,88 $\pm$ 14,39               | 98,36 $\pm$ 16,64                | 81,69 $\pm$ 19,92               | 88,64 $\pm$ 29,19                |
| VNL ( $\mu\text{m}^3$ )                 | 49,15 $\pm$ 13,85 <sup>a</sup>  | 43,42 $\pm$ 11,30 <sup>ab</sup>  | 30,06 $\pm$ 11,95 <sup>b</sup>  | 33,00 $\pm$ 4,26 <sup>ab</sup>   |
| V Cito. L ( $\mu\text{m}^3$ )           | 118,06 $\pm$ 42,06 <sup>a</sup> | 113,44 $\pm$ 37,95 <sup>ab</sup> | 79,65 $\pm$ 25,59 <sup>b</sup>  | 101,29 $\pm$ 16,73 <sup>ab</sup> |
| Nº CL/t ( $\times 10^6$ )               | 93,42 $\pm$ 42,74               | 106,56 $\pm$ 44,02               | 105,47 $\pm$ 42,59              | 103,01 $\pm$ 38,87               |
| Nº CL/gt ( $\times 10^6$ )              | 484,73 $\pm$ 110,55             | 665,42 $\pm$ 189,12              | 551,89 $\pm$ 195,95             | 461,24 $\pm$ 103,19              |
| ILS (%)                                 | 0,04 $\pm$ 0,01                 | 0,05 $\pm$ 0,01                  | 0,05 $\pm$ 0,01                 | 0,05 $\pm$ 0,01                  |

DNL - Diâmetro Nuclear de Leydig; VCL - Volume de Célula de Leydig; VL/t – Volume de Leydig por testículo; VL/gt – Volume de Leydig por gramas de testículo; VNL - Volume do Núcleo de Leydig; V Cito. L - Volume do Citoplasma de Leydig; Nº CL/t - Número de célula de Leydig por testículo; Nº CL/gt - Número de célula de Leydig por grama de testículo; ILS - Índice Leydigossomático. Dose única diária, exposição crônica (n = 6). Dados expressos como média  $\pm$  DP. Letras diferentes, mostram valores significativamente diferentes na mesma linha, em relação ao controle ( $p \leq 0,05$ ) (Student Newman Keuls).

### 3.5 Testosterona

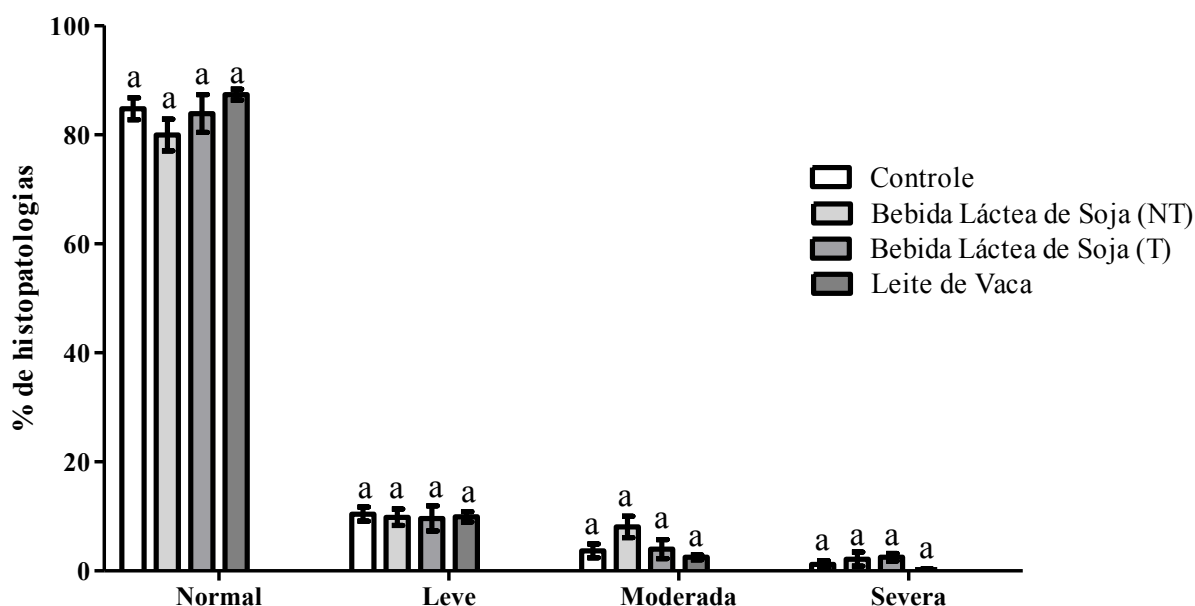
Os dados referentes a concentração de testosterona sérica estão descritos na Figura 4. Não houve alterações significativas na concentração de testosterona em nenhum dos grupos tratados, quando comparados ao controle.



**Figura 4** - Concentração de testosterona sérica de camundongos Balb C, adultos, expostos a bebidas lácteas de soja com grãos não transgênicos (NT) e transgênicos (T), e leite de vaca, durante 42 dias. Dose única diária, exposição crônica (n = 6). Dados expressos como média ± DP. Letras diferentes, mostram valores significativamente diferentes na mesma linha, em relação ao controle ( $p \leq 0,05$ ) (Student Newman Keuls).

### 3.6 Histopatologia testicular

O percentual de histopatologia testicular está representado na Figura 5. Não houve alteração significativa nas proporções de túbulos normais, com patologias leves, moderadas e severas nos grupos tratados, quando comparados ao controle.



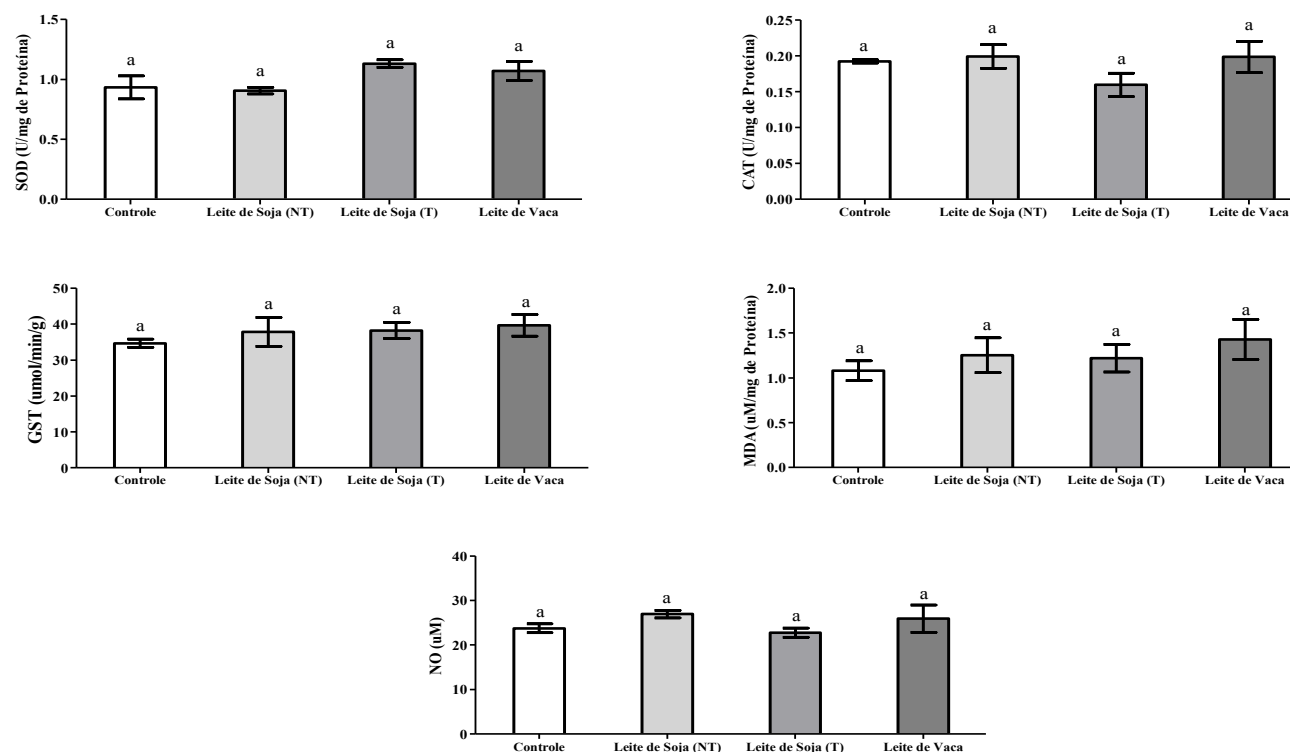
**Figura 5** - Proporção de túbulos seminíferos normais e com patologias nos testículos de camundongos Balb C, adultos, expostos a bebidas lácteas de soja com grãos não transgênicos (NT) e transgênicos (T), e leite de vaca, durante 42 dias. Dose única diária, exposição crônica (n = 6). Dados expressos como média  $\pm$  DP. Letras diferentes, mostram valores significativamente diferentes na mesma linha, em relação ao controle ( $p \leq 0,05$ ) (Student Newman Keuls).

### 3.7 Análise antioxidante (Sequestro por DPPH)

As bebidas lácteas de soja com grãos não transgênicos, transgênicos e de vaca não tiveram uma taxa alta de sequestro por DPPH. Os resultados obtidos das bebidas lácteas e do leite de vaca foram comparados com os antioxidantes comerciais BHT, ácido ascórbico e rutina, mostrando que os compostos testados não possuem atividade antioxidante.

### 3.8 Análise do estado oxidativo

Dados referentes as atividades das enzimas antioxidantes Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione-S-transferase (GST); dos metabólitos de peroxidação lipídica, Malondialdeído (MDA) e do estresse nitroso, Óxido nítrico (NO), estão descritos na Figura 6. Não houve alterações significativas em nenhum dos grupos tratados em relação as enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GST), aos metabólitos de peroxidação lipídica (MDA) e o estresse nitroso (NO), quando comparados ao grupo controle.



**Figura 6** – Atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GST), dos metabólitos de peroxidação lipídica (MDA) e do estresse nitroso (NO) do testículo de camundongos Balb C, adultos, expostos a bebidas lácteas de soja com grãos não transgênicos (NT) e transgênicos (T), e leite de vaca, durante 42 dias. SOD - Superóxido dismutase; CAT - Catalase; GST - Glutaciona-S-transferase; MDA - Malondialdeído; NO - Óxido Nítrico. Dose única diária, exposição crônica (n = 6). Dados expressos como média ± DP. Letras diferentes, mostram valores significativamente diferentes na mesma linha, em relação ao controle ( $p \leq 0,05$ ) (Student Newman Keuls).

#### 4. DISCUSSÃO

Este estudo foi pioneiro na avaliação dos efeitos das bebidas lácteas de soja (com grãos não transgênicos e transgênicos) e leite de vaca nos parâmetros biométricos, histomorfométricos, histopatológicos, hormonal e do estado oxidativo dos testículos de camundongos Balb C adultos. Dados disponíveis na literatura relatam apenas informações sobre os parâmetros biométricos corporal e testicular com grãos de soja e seus compostos isolados (Lozi *et al.*, 2021). Neste trabalho, observamos que o período de tratamento por 42 dias com camundongos Balb C, por via oral, e com as análises utilizadas, não foi capaz de interferir na estrutura testicular após absorção dos compostos testados. Em especial, foram observadas diminuição do peso corporal e da albugínea, da altura do epitélio seminífero e área de epitélio, aumento no diâmetro e área de lume, redução do percentual de vasos sanguíneos e o espaço linfático, volume de vaso sanguíneo, no diâmetro nuclear, volume da célula, do núcleo e do citoplasma de Leydig. O testículo é um órgão complexo e qualquer alteração em sua arquitetura pode gerar graves consequências para a reprodução.

Os dados biométricos de peso corporal (PC) sofreram redução nos grupos tratados com as bebidas lácteas de soja com grãos não transgênicos e transgênicos. O peso corporal fornece informações importantes sobre a ação de um composto e suas possíveis implicações para a saúde (Fernandez *et al.*, 2008). Resultados similares aos deste estudo também foram observados por Roberts *et al.* (2000) com genisteína (5 mg/kg por 130 dias), Delclos *et al.* (2001) com genisteína (1250 mg/L por 50 dias), Guan *et al.* (2008) com genisteína/daidzeína (150, 300 e 600 mg/kg por 84 dias) e Piotrowska *et al.* (2011) com genisteína/daidzeína (200 mg/kg por 90 dias). A perda de peso em excesso, de animais experimentais que vivem dentro das mesmas condições pode indicar que o composto administrado pode estar gerando alterações moleculares que não foram avaliadas e que ainda não refletiram na morfologia do tecido. Já o peso da albugínea, reduziu apenas nos grupos tratados com as bebidas lácteas de soja com grãos não transgênicos e leite de vaca. Por outro lado, com relação à diminuição do peso da albugínea, encontramos na literatura discordância com nossos resultados em animais tratados com outras espécies de plantas. Dias *et al.* (2019) não observaram alterações no peso da albugínea testicular de camundongos tratados com extrato de raízes de *Pfaffia glomerata* por 42 dias. O peso do testículo (PT) e do parênquima testicular, além dos índices gonadossomático (IGS) e parenquimossomático (IPS) não sofreram alterações significativas. Grgurevic *et al.* (2016), observaram que camundongos machos tratados com leite de vaca com estrogênio natural e leite de vaca com  $17\beta$ -estradiol, também não tiveram alterações no peso

PT. Também não foram observadas alterações no IGS e PT por Gomes *et al.* (2011) com *Heteropterys aphrodisiaca*, Monteiro *et al.* (2012) com *Rudgea viburnoides* e Oshio *et al.* (2015) com *Ginkgo biloba* em ratos Wistar. A redução do peso corporal nos animais tratados com as bebidas lácteas de soja pode indicar o início de outras alterações histológicas que ainda não se tornaram visíveis, uma vez que todos os animais estavam expostos as mesmas condições. Um período maior de tratamento com os compostos testados, poderia trazer mais informações sobre os efeitos das bebidas lácteas de soja e do leite de vaca nas estruturas testiculares, que não foram possíveis de serem observadas em 42 dias.

Em relação a altura (AE) e área de epitélio observou-se diminuição, como compensação, encontramos também diminuição do diâmetro (DL) e área de lume em animais tratados com leite de vaca. Esses parâmetros não apresentaram alterações nos animais tratados com as bebidas lácteas de soja. Segundo Ma, *et al.* (2009), o leite de vaca apresenta efeitos adversos no sistema reprodutivo de camundongos machos ICR. Na literatura dados semelhantes aos obtidos com as bebidas lácteas foram encontrados, onde Melo *et al.* (2010) e Gomes *et al.* (2011), utilizando *T. fasciculatus* e *H. aphrodisiaca*, respectivamente, não observaram alterações na AE. Em discordância com nossos resultados, Meena *et al.* (2017) observaram diminuição na AE e no DL em ratos Wistar tratados com genisteína nas doses de 2, 20 e 100 mg/Kg por 100 dias. A diminuição da altura e da área de epitélio, bem como o aumento do diâmetro e área de lume, pode estar relacionada com alterações na produção espermática, pois as células germinativas encontram-se no epitélio seminífero. O tempo e a quantidade diária de consumo do leite de vaca pode influenciar no surgimento de alterações nesses parâmetros. Então, nosso objetivo é continuar estudando a ação das bebidas lácteas de soja e leite de vaca para tentar preencher estas lacunas do conhecimento, especialmente em relação ao tempo de exposição e aos mecanismos intracelulares ativados após a exposição.

Nenhum dos parâmetros avaliados em relação ao percentual e volume dos componentes tubulares, as células germinativas, célula de Sertoli, índices mitótico e meiótico, e rendimento espermático tiveram alterações. Diferentemente de nossos resultados, Assinder *et al.* (2007), em um estudo com genisteína/daidzeína/gliciteína na dose de 0,465 mg/kg por 24 dias e Modaresi *et al.* (2011) com genisteína/daidzeína a 20, 30, 50% na comida por 63 dias, observaram diminuição das células germinativas. Morte das células germinativas foram encontradas por Robertson *et al.* (2002) em animais tratados com genisteína/daidzeína na dose de 146 mg/kg por 65 dias e por Assinder *et al.* (2007), em um estudo com genisteína/daidzeína/gliciteína a dose de 0,465 mg/kg por 24 dias. Delclos *et al.* (2001)

observaram danos a nível celular das células germinativas em animais tratados com genisteína na dose de 1250 mg/L por 50 dias. Encontramos na literatura que altas doses de daidzeína (0,03/ 0,3 / 3 ou 30  $\mu\text{mol/l}$  *in vitro* por 72 h) podem exercer efeitos adversos nas células de Sertoli em testículos de camundongos neonatos (Zhu *et al.*, 2016). Os trabalhos que encontraram alterações nas células de Sertoli e nas células germinativas usaram as isoflavonas majoritárias da soja isoladas. Em relação a esses parâmetros, o funcionamento normal do testículo após tratamento com os compostos testados, indica que o processo espermatogênico dos animais não foi afetado. A falta de trabalhos com os compostos testados neste estudo dificulta a comparação dos resultados obtidos. Acredita-se que muitos fatores podem influenciar no surgimento de mais alterações nestes parâmetros, como tempo de tratamento, dose, idade dos animais, fases da vida, além do uso de compostos conjugados ou isolados.

O percentual de intertúbulo, de célula, citoplasma e núcleo de Leydig permaneceram inalterados em todos os grupos experimentais, assim como tecido conjuntivo e macrófagos. Em contrapartida, Meena *et al.* (2017) em um estudo com a isoflavona majoritária da soja (Genisteína nas doses de 2, 20 and 100 mg/kg por 100 dias) em ratos Wistar no período pós-desmame (21 dias) por via intraperitoneal observaram diminuição do intertúbulo. Zhu *et al.* (2016) relataram que não houve alterações na proliferação das células de Leydig após exposição a daidzeína (30  $\mu\text{mol/l}$  - *in vitro*), não obtendo aumento do percentual celular, porém, um potencial efeito nocivo na função da esteroidogênese testicular durante o período neonatal precoce foi identificado. Sherrill *et al.* (2010), em um experimento com ratos, no período pré-natal, tratados com soja integral (concentração de isoflavonas nas dietas experimentais de 0, 5, 50 ou 1000 ppm com base no conteúdo testado de genisteína e daidzeína) na dieta observaram aumento no percentual das células de Leydig. Os percentuais de vasos sanguíneos e do espaço linfático reduziram apenas nos grupos tratados com leite de vaca. Essas alterações podem ter ocorrido devido a diminuição da altura de epitélio e aumento do diâmetro de lume. Além disso, em um tempo maior de exposição, mais alterações poderiam surgir, levando em consideração a importância dos vasos sanguíneos nesta região. Resultados semelhantes aos obtidos com as bebidas lácteas de soja, foram encontrados em um estudo com camundongos expostos ao óleo da *Euterpe oleracea* (150 mg/kg - 42 dias), que possui isoflavonas em sua composição (Kang *et al.*, 2010; Darnet *et al.*, 2011;), onde o percentual de vasos sanguíneos e do espaço linfático não sofreram alterações (Mouro *et al.*, 2020). O fato dos animais utilizados neste estudo serem adultos e o tempo de exposição de 42 dias, podem ter sido fatores que influenciaram no surgimento de alterações mais agravantes nesses

parâmetros.

Com base nos resultados obtidos em relação ao volume dos componentes intertubulares, após o período de tratamento, apenas o volume de vasos sanguíneos reduziu nos animais tratados com leite de vaca, permanecendo inalterados nos tratados com as bebidas lácteas de soja. Diferentemente, Mouro *et al.* (2020) não observaram nenhuma alteração no volume dos componentes intertubulares após exposição de camundongos ao óleo da *Euterpe oleracea* na dose de 150 mg/kg por 42 dias. A idade dos animais, o tempo e a dose de exposição aos compostos testados podem ter influenciado no surgimento de mais alterações nestes parâmetros.

Os parâmetros morfométricos e estereológicos das células de Leydig trazem informações importantes sobre o funcionamento da espermatogênese, uma vez que a testosterona produzida por estas células é um hormônio essencial em todo processo. Neste trabalho, a porcentagem, o volume e número de célula de Leydig por testículo e por grama de testículo, bem como o índice Leydigossomático permaneceram inalterados, porém, o diâmetro nuclear, volume da célula, do núcleo e do citoplasma de Leydig reduziram significativamente apenas no grupo tratado com a bebida láctea de soja transgênica. Muitas alterações nas células de Leydig são relatadas na literatura em animais tratados com as isoflavonas da soja isoladas, como redução na proliferação celular, além da redução da síntese de proteínas intracelulares que fazem a conversão da androstenediona em testosterona, em animais tratados com genisteína e daidzeína (50 e 100 mg/L) (Sherrill *et al.*, 2010; Pfaehler *et al.*, 2012; Musameh *et al.*, 2014; Meena *et al.*, 2017). Akingbemi *et al.* (2015) relataram que animais tratados com genisteína e daidzeína nas doses 50 e 100 mg/L, apresentaram redução das proteínas que fazem o transporte da molécula de colesterol para as mitocôndrias, reduzindo a síntese de testosterona. A redução da capacidade proliferativa das células de Leydig, bem como das proteínas que fazem parte da síntese da testosterona, podem levar a redução desse hormônio, que é essencial para espermatogênese. Mouro *et al.* (2020) não relataram alterações na morfometria e estereologia das células de Leydig em animais tratados com o óleo da *Euterpe oleracea*, que possui concentrações de isoflavonas, na dose de 150 mg/kg. A exposição perinatal à isoflavonas da soja possivelmente exerce efeitos diferenciais na capacidade da enzima esteroideogênica nas células de Leydig (Zhu *et al.*, 2016). A idade dos animais utilizadas neste estudo pode ter influenciado no surgimento de mais alterações nestes parâmetros. Possivelmente estes efeitos estão associados a alterações na produção de Testosterona.

A testosterona é o principal hormônio responsável pelo surgimento das características secundárias masculinas e pela manutenção da espermatogênese (Russell e Griswold, 1993).

Alterações na concentração deste hormônio pode gerar danos nas funções testiculares, levando à infertilidade (Srilatha e Adaikan, 2003). No presente trabalho não foram observadas alterações significativas na concentração de testosterona em nenhum dos grupos tratados. Outros estudos mostraram resultados contraditórios aos nossos, indicando diminuição da testosterona sérica em animais expostos a genisteína e daidzeína em ratos pós-desmame (21 dias) por um período maior de exposição, de 84 dias (Guan et al., 2008) e 90 dias (Piotrowska et al., 2011; Pfähler et al., 2012). Meena et al. (2017) também relataram diminuição da testosterona em ratos pós-desmame expostos a genisteína por 100 dias. Dados na literatura também mostraram redução da testosterona sérica em ratos adultos tratados com equol por 5 dias (Loutchanwoot et al., 2013; Loutchanwoot et al., 2014). Além disso, outros estudos relatam diminuição deste hormônio em camundongos adultos com genisteína e daidzeína por 112 dias (Cline et al., 2004), em ratos pós-desmame com genisteína, daidzeína e gliciteína por 90 dias (Sherrill et al., 2010) e em camundongos no período juvenil (35 dias) com genisteína e daidzeína por 63 dias (Modaresi et al., 2011). Segundo Zhu *et al.* (2016) a secreção de testosterona também foi suprimida pela daidzeína (30  $\mu\text{mol/l}$ ) nas células de Leydig após um período de exposição de 72 horas *in vitro*. A administração das bebidas lácteas de soja e de vaca durante um ciclo da espermatogênese, nas doses utilizadas, não alterou os níveis séricos de testosterona. Entretanto, o tratamento com a bebida láctea de soja durante esse período causou alterações morfológicas nas células de Leydig. Assim, não se exclui efeito da bebida láctea de soja na produção de testosterona após um período maior de tratamento. Porém, não foi dosada a testosterona *in situ*, alterações deste hormônio do testículo pode ter ocorrido, não sendo possível ser detectada sistemicamente. Neste caso, um período mais prolongado de exposição, pode refletir em variações sistêmicas.

Neste estudo, não foi observada diminuição nos túbulos seminíferos normais, nem surgimento de túbulos com patologias leves, moderadas e severas nos grupos tratados. Na literatura foram encontradas informações diferentes, como o aumento de patologias leves em animais tratados com óleo da *Euterpe oleracea* na dose de 150 mg/kg por 42 dias (Mouro *et al.*, 2020), de leves nas doses de 100 e 200 mg/kg e moderadas na dose de 400 mg/kg) do extrato de *Pfaffia glomerata* por 42 dias (Dias *et al.*, 2019). Além disso, ratos pós-desmame tratados com genisteína e daidzeína por 112 dias apresentaram atrofia severa do epitélio seminífero (Cline *et al.*, 2004). Meena et al. (2017) descrevem o surgimento de desorganização do epitélio seminífero e dissociação celular em ratos tratados com genisteína nas doses de 2, 20 e 100 mg/kg durante um período experimental de 100 dias. As isoflavonas da soja isoladas possuem um efeito mais agravante no organismo, quando comparado aos efeitos do consumo da soja na forma de bebida

láctea. Ainda que em nosso trabalho o tratamento tenha sido feito com bebidas lácteas de soja, algumas alterações foram relatadas, indicando que com um tempo maior de exposição, mais alterações poderiam ser registradas, uma vez que as isoflavonas estão presentes nas bebidas lácteas de soja. Segundo Setchell e Cole (2003), as bebidas lácteas de soja possuem alto teor de isoflavonas, variando de 30,02 mg/L a 63,6 mg/L.

As bebidas lácteas de soja com grãos não transgênicos, transgênicos e leite de vaca não apresentaram atividade antioxidante quando comparados a antioxidantes comerciais (BHT, ácido ascórbico e rutina). Na literatura, foi observado que em bebidas lácteas de soja fermentado, os microorganismos que fazem a fermentação também produzem antioxidantes, levando a um resultado diferente do obtido neste trabalho (Zhou *et al.*, 2021). Yamamoto *et al.* (2019) e Hwang *et al.* (2021) relatam que *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus pentosaceus* MYU 759 e *L. plantarum* promovem a conversão de isoflavonas em agliconas e proteínas em peptídeos, aumentando sua ação contra radicais livres. Neste trabalho não foram utilizadas bebidas lácteas fermentadas e, devido a isso, a capacidade antioxidante pode não ter sido aumentada.

Desbalanço redox são alterações que podem ocorrer no organismo caso ele entre em contato com uma substância tóxica, levando a vários efeitos colaterais, às vezes irreversíveis, sendo reflexo de um desequilíbrio celular, conhecido como estresse oxidativo (Inal *et al.*, 2001; El-Demerdash *et al.*, 2009). O mecanismo de defesa antioxidante testicular é altamente complexo e eficiente, podendo eliminar e/ou inibir o surgimento de espécies reativas de oxigênio (EROs), com a ajuda das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GST (Vernet *et al.*, 2004). A SOD, que faz parte da primeira linha de defesa celular, atua contra esses efeitos deletérios, catalisando a dismutação dos radicais ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) em peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que rapidamente é degradado pela CAT em água e radical hidroxila (Inal *et al.*, 2001; El-Demerdash *et al.*, 2009). Neste trabalho não houve alterações significativas em nenhum dos grupos tratados em relação as enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GST), os metabólitos de peroxidação lipídica, o malondialdeído (MDA) e o estresse nitroso, o óxido nítrico (NO). Na literatura, Mouro *et al.* (2020) em um estudo com o óleo da *Euterpe oleracea* na dose de 150 mg/kg, encontraram aumento apenas no MDA. Dias *et al.* (2019) também observaram alterações nas enzimas antioxidantes, como aumento da SOD (200 e 400 mg/kg), da CAT (100 mg/kg) e da GST (200 mg/kg), além de diminuição do MDA (100 e 200 mg/kg) e aumento do NO (200 mg/kg) em animais tratados com o extrato de *Pfaffia glomerata*. Nossos resultados indicam que o desbalanço redox não ocorreu em animais expostos diariamente as

bebidas lácteas de soja (com grãos não transgênicos e transgênicos) e de vaca por 42 dias. Segundo Lozi *et al.* (2021, não existem trabalhos na literatura que avaliem o estado oxidativo dos animais experimentais tratados com soja e seus derivados. Com base nos resultados encontrados neste trabalho, podemos dizer que em um período maior de exposição aos compostos testados e em animais com idades diferentes, mais alterações significativas podem surgir.

## 5. CONCLUSÕES

No presente trabalho concluímos que as bebidas lácteas de soja podem diminuir a esteroidogênese, uma vez que afetou as células de Leydig e o leite de vaca utilizado, pode afetar a espermatogênese, uma vez que diminuiu o epitélio. Com o método utilizado, os compostos testados não apresentaram atividades antioxidantes. A administração das bebidas lácteas de soja e de vaca durante um ciclo da espermatogênese, não altera os níveis séricos de testosterona. Entretanto, o tratamento com as bebidas lácteas de soja durante esse período causa alterações morfológicas nas células de Leydig. Assim, não se exclui o efeito das bebidas lácteas de soja na produção de testosterona após um período maior de tratamento. Ainda, o tratamento com leite de vaca resultou em alterações histológicas testiculares, caracterizados como diminuição da altura e da área do epitélio seminífero, do percentual de vasos sanguíneos e do espaço linfático e aumento do diâmetro e da área do lume tubular. Como o testículo é um órgão complexo, qualquer alteração em sua arquitetura pode gerar graves consequências para a reprodução. A idade, o tempo e a dose de exposição utilizados neste trabalho podem ter sido insuficientes para o surgimento de grande variedade de alterações nos parâmetros avaliados. Nossos resultados revelam que o tratamento com as bebidas lácteas de soja e o leite de vaca, durante um ciclo espermatogênico, resultam em alterações nas células de Leydig e nos túbulos seminíferos, respectivamente, não excluindo que o consumo desses compostos por um período maior pode resultar em prejuízos para as funções testiculares.

## 6. REFERÊNCIAS

- ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear population from microtome sections. *The Anatomical Record*, 239-247, 1946.
- AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymology*, 105:121-126, 1984.
- AKINGBEMI, B.T.; BRADEN, T.D.; KEMPPAINEN, B.W.; HANCOCK, K.D.; SHERRILL, J.D.; COOK, S.J.; HE, X.; SUPKO, J.G. Exposure to Phytoestrogens in the Perinatal Period Affects Androgen Secretion by Testicular Leydig Cells in the Adult Rat. *Endocrinology*, 148(9):4475-4488, 2015.
- AMANN, R. P.; ALMQUIST, J. O. Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. *Journal of Dairy Science*, 45(6):774-781, 1962.
- AMANN, R. P. The Male Rabbit. IV. Quantitative Testicular Histology and Comparisons Between Daily Sperm Production as Determined Histologically and Daily Sperm Output. *Fertility and Sterility*, 21(9):662-672, 1970.
- ASSINDER, S.; DAVIS, R.; FENWICK, M.; GLOVER, A. Adult-only exposure of male rats to a diet of high phytoestrogen content increases apoptosis of meiotic and post-meiotic germ cells. *Reproduction*, 133(1):11-19, 2007.
- BERNDTSON, W. E. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *Journal of Animal Science*, 44(5):818-833, 1977.
- BERNDTSON, W.E.; NEEFUS, C.; FOOTE, R.H.; AMANN, R.P. Optimal replication for histometric analyses of testicular function in rats or rabbits. *Fundamental and Applied Toxicology*, 12:291-302, 1989.
- BRANCA, F.; LORENZETTI, S. Health effects of phytoestrogens. *Forum Nutrition*, 5:110-111, 2005.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1):25-30, 1995.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation methods. *Methods in Enzymology*, 2:302-310, 1978.
- BU, L.; SETCHELL, K.D.; LEPHART, E.D. Influences of dietary soy isoflavones on metabolism but not nociception and stress hormone responses in ovariectomized female rats. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 26:3-8, 2005.
- CHAVARRO, J.E.; TOTH, T.L.; SADIO, S.M.; HAUSER, R. Soy Food and Isoflavone Intake in Relation to Semen Quality Parameters Among Men From an Infertility Clinic Comment. *Human Reproduction*, 23(11):2584-2590, 2008.
- CLINE, J. M.; FRANKE, A.A.; REGISTER, T.C.; GOLDEN, D.L.; ADAMS, M.R. Effects of dietary isoflavone aglycones on the reproductive tract of male and female mice. *Toxicologic Pathology*, 32(1):91-99, 2004.

- COTRONEO, M.S.; WANG, J.; ELTOUM, I.A.; LAMARTINIERE, C.A. Sex steroid receptor regulation by genistein in the prepubertal rat uterus. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 173(1-2):135-145, 2001.
- DARNET, S.; SERRA, J.L.; RODRIGUES, A. M.C.; SILVA, L.H.M. A high-performance liquid chromatography method to measure tocopherols in assai pulp (*Euterpe oleracea*). *Food Research International*, 44(7):2107-2111, 2011.
- DELCLOS, K.B.; BUCCI, T.J.; LOMAX, L.G.; LATENDRESSE, J.R.; WARBRITTON, A., WEIS, C.C.; NEWBOLD, R.R. Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD (Sprague-Dawley) rats. *Reproductive Toxicology*, 15(6):647-663, 2001.
- DIAS, F.C.R.; MARTINS, A.L.P.; DE MELO, F.C.S.A.; CUPERTINO, M.C.; GOMES, M.L.M.; DE OLIVEIRA, J.M.; DAMASCENO, E.M.; SILVA, J.; OTONI, W.C.; DA MATTA, S.L.P. Hydroalcoholic extract of *Pfaffia glomerata* alters the organization of the seminiferous tubules by modulating the oxidative state and the microstructural reorganization of the mice testes. *Journal of Ethnopharmacology*, 233:179-189, 2019.
- DIETERICH, S.; BIELIGK, U.; BEULICH, K.; HASENFUSS, G.; PRESTLE, J. Gene Expression of Antioxidative Enzymes in the Human Heart: Increased Expression of Catalase in the End-Stage Failing Heart. *Journal of the American Heart Association*, 101:33-39, 2000.
- DROGE, W. Free radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews*, 87:47-95, 2002.
- EL-DEMERDASH, F.M.; YOUSEF, M.I.; RADWAN, F.M. Ameliorating effect of curcumin on sodium arsenite induced oxidative damage and lipid peroxidation in different rat organs. *Food and Chemical Toxicology*, 47:249-254, 2009.
- FALCÃO, D.Q.; COSTA, E.R.; ALVIANO, D.S.; ALVIANO, C.S.; KUSTER R.M.; MENEZES, F.S. Atividade antioxidante e antimicrobiana de *Calceolaria chelidonioides* Humb. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16(1):73-76, 2006.
- FARMAKALIDIS, E.; HATHCOCK, J.N.; MURPHY, P.A. Oestrogenic potency of genistin and daidzin in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 23:741-5, 1985.
- FERNANDEZ, C.D.B.; PORTO, E.M.; ARENA, A.C.; KEMPINAS, W.G. Effects of altered epididymal sperm transit time on sperm quality. *International Journal of Andrology*, 31:427-437, 2008.
- FLACHOWSKY, G.; HÜNERBERG, M.; MEYER, U.; KAMMERER, D.R.; CARLE, R.; GOERKE, M.; EKLUND, M. Isoflavone concentration of soybean meal from various origins and transfer of isoflavones into milk of dairy cows. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 6:449-456, 2011.
- FOLMAN, Y.; POPE, G.S. The interaction in the immature mouse of potent oestrogens with coumestrol, genistein and other uterovaginitrophic compounds of low potency. *Journal of Endocrinology*, 34:215-218, 1966.

- FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D. The testis of domestic mammals. In: Martinez-Garcia F., Regadera J., editors. Male Reproduction - a Multidisciplinary Overview. *Churchill Communications*, Madrid, Spain, 198-219, 1998.
- GOMES, M.L.M.; MONTEIRO, J.C.; FREITAS, K.M.; SBERVELHERI, M.M.; DOLDER, H. Association of the infusion of *Heteropterys aphrodisiaca* and endurance training brings spermatogenetic advantages. *Biological Research*, 44:235-241, 2011.
- GRGUREVIC, N.; KORACIN, J.; MAJDIC, G.; SNOJ, T. Effect of dietary estrogens from bovine milk on blood hormone levels and reproductive organs in mice. *Journal of Dairy Science*, 99(8):6005-6013, 2016.
- GUAN, L.; HUANG, Y.; CHEN, Z.Y. Developmental and reproductive toxicity of soybean isoflavones to immature SD rats. *Biomedical and Environmental Sciences*, 21(3):197-204, 2008.
- HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 249(22):7130-7139, 1974.
- HWANG, C.E.; KIM, S.C.; KIM, D.H.; LEE, H.Y.; SUH, H.K.; CHO, K.M.; LEE, J.H. Enhancement of isoflavone aglycone, amino acid, and CLA contents in fermented soybean yogurts using different strains: Screening of antioxidant and digestive enzyme inhibition properties. *Food Chemistry*, 340:128199, 2021.
- INAL, M.E.; KANBAK, G.; SUNAL, E. Antioxidant enzymes activities and malondialdehyde levels related to aging. *Clinica Chimica Acta*, 305:75-80, 2001.
- JEFFERSON, W.N.; PADILLA-BANKS, E.; NEWBOLD, R. R. Adverse effects on female development and reproduction in CD-1 mice following neonatal exposure to the phytoestrogen genistein at environmentally relevant doses. *Biology of Reproduction*, 73(4):798-806, 2005.
- JOHNSON, L.; PETTY, C. S.; NEAVES W.B. A new approach to quantification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermiogenesis. *Biology of Reproduction*, 25:217-226, 1981.
- JOHNSON, S.G. Testicular biopsy score count - a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and Results in 335 Hypogonadal males. *Hormones*, 1:2-25, 1970.
- KANG, J.; LI, Z.; WU, T.; JENSEN, G. S.; SCHAUSS, A. G.; WU, X. Anti-oxidant capacities of flavonoid compounds isolated from acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.). *Food Chemistry*, 122(3):610-617, 2010.
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 27:137A, 1965.
- KIM, Y.K.; GUO, Q.; PACKER, L. Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts. *Toxicology*, 172(2):149-156, 2002.
- KREIGER, D.T.; PORLOW, M.J.; GIBSON, M.J.; DAVIS, T.F. Brain grafts reverse hypogonadism of gonadotropin releasing hormone deficiency. *Nature*, 298:468-471, 1982.

- KŘÍŽOVÁ, L.; DADÁKOVÁ, K.; KAŠPAROVSKÁ, J.; KAŠPAROVSKÝ, T. Isoflavones. *Molecules*, 24(6):1076, 2019.
- LIU, Y.; CAI, J.; ZHANG, F. Functional comparison of breast milk, cow milk and goat milk based on changes in the intestinal flora of mice. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 150:1-8, 2021.
- LOUTCHANWOOT, P.; SRIVILAI, P.; JARRY, H. Effects of the natural endocrine disruptor equol on the pituitary function in adult male rats. *Toxicology*, 304:69-75, 2013.
- LOUTCHANWOOT, P.; SRIVILAI, P.; JARRY, H. Lack of anti-androgenic effects of equol on reproductive neuroendocrine function in the adult male rat. *Hormones and Behavior*, 65(1):22-31, 2014.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A. L.; RANDALL, R.L. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193:265-275, 1951.
- LOZI, A.A.; DA MATTA, S.L.; SARANDY, M.M.; DE MELO, F.C.S.A.; ARAUJO, D.C; NOVAES, R.D.; GONÇALVES, R.V. Relevance of the Isoflavone Absorption and Testicular Function: A Systematic Review of Preclinical Evidence. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1741-427X, 2021.
- MA, Y.X.; EBINE, N.; AOKI, K.; KUSUNOKI, M.; MISUMI, J. Effects of cow's milk on reproduction in ICR male mice. *Biomedical and Environmental Sciences*, (2):161-3, 2009.
- MCCORMICK, D.L.; JOHNSON, W.D.; BOSLAND, M.C.; LUBET, R.A.; STEELE, V.E. Chemoprevention of rat prostate carcinogenesis by soy isoflavones and by Bowman-Birk inhibitor. *Nutrition and Cancer*, 57(2):184-193, 2007.
- MEDEIROS, L.C.S.; SPERIDIÃO, P.G.L.; SDEPANIAN, V.L.; FAGUNDES-NETO, U.; MORAIS, M.B. Ingestão de nutrientes e estado nutricional de crianças em dieta isenta de leite de vaca e derivados. *Jornal de Pediatria*, 80(5):363-370, 2004.
- MEDIGOVIĆ, I.M.; ŽIVANOVIĆ, J.B.; AJDŽANOVIĆ, V.Z.; NIKOLIĆ-KOKIĆ, A.L.; STANKOVIĆ, S.D.; TRIFUNOVIĆ, S.L.; MILOŠEVIĆ, V.L.J.; NESTOROVIĆ, N.M. Effects of soy phytoestrogens on pituitary-ovarian function in middle-aged female rats. *Endocrine*, 50(3):764-76, 2015.
- MEENA, R.; SUPRIYA, C.; PRATAP, R.; SREENIVASULA, P. Altered spermatogenesis, steroidogenesis and suppressed fertility in adult male rats exposed to genistein, a non-steroidal phytoestrogen during embryonic development. *Food and Chemical Toxicology*, 99:70-77, 2017.
- MELO, F.C.S.A.; MATTA, S.L.P.; PAULA, T.A.R.; GOMES, M.L.M.; OLIVEIRA, L.C. The effects of *Tynnanthus fasciculatus* (Bignoniaceae) infusion on testicular parenchyma of adult Wistar rats. *Biological Research*, 43:445-450, 2010.
- MODARESI, M.; MESSRIPOUR, M.; KHORAMI, H. Effect of soybean on male reproductive physiology in mice. *Proceedings of the International Conference on Life Science and Technology*, 15-18. 2011.

- MONTEIRO, J.C.; DA MATTA, S.L.P.; PREDES, F.S.; DE PAULA, T.A.R. Testicular morphology of adult wistar rats treated with *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. Leaf infusion. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55:101-105, 2012.
- MOURO, V.G.S.; DE MELO, F.C.S.A.; MARTINS, A.L.P.; DE LUCCA, M.G.M.; DE OLIVEIRA, J.M.; DE FREITAS, M.B.D.; DEMUNER, A.J.; LEITE, J.P.V.; DA MATTA, S.L.P. *Euterpe oleracea* (Martius) Oil Reverses Testicular Alterations Caused after Cadmium Administration. *Biological Trace Element Research*, 197(2):555-570, 2020.
- MOURO, V.G.S.; SIMAN, V.A.; DA SILVA, J.; DIAS, F.C.R.; DAMASCENO, E.M.; CUPERTINO, M.D.C.; DE MELO, F.C.S.A.; DA MATTA, S.L.P. Cadmium-Induced Testicular Toxicity in Mice: Subacute and Subchronic Route-Dependent Effects. *Biological Trace Element Research*, 193(2):466-482, 2020.
- MUSAMEH, N.I.; ZIN, S.R.; KASSIM, N.M. Effects of genistein on male sprague dawley rats reproductive development. *Biomedical Research*, 25(3):391-400, 2014.
- NAJAF, N.; GHAZANFARPOUR, M.N. Effect of phytoestrogens on sexual function in menopausal women: a systematic review and meta-analysis. *Climacteric*, 21(5):437-445, 2018.
- NAVARRO, M.C. Mecanismo de acción de las isoflavonas. *Ginecología y Obstetricia Clínica*, 6:159-165, 2005.
- OSHIO, L.T.; RIBEIRO, C.C.T.; MARQUES, R.M.; MATTA, S.L.P.; REIS, J.E.P.; SILVEIRA E SA, R.C.; CAMPOS, L.V.; PETERS, V.M. Effect of *Ginkgo biloba* extract on sperm quality, serum testosterone concentration and histometric analysis of testes from adult Wistar rats. *Journal of Medicinal Plants Research*, 9:22-131, 2015.
- PIOTROWSKA, K., BARANOWSKA-BOSIACKA, I., MARCHLEWICZ, M., GUTOWSKA, I., NOCÉN, I., ZAWIŚLAK, M., CHLUBEK, D., WISZNIEWSKA, B. Changes in male reproductive system and mineral metabolism induced by soy isoflavones administered to rats from prenatal life until sexual maturity. *Nutrition*, 27(3):372-379, 2011.
- PFAEHLER, A.; NANJAPPA, M. K.; COLEMAN, E. S.; MANSOUR, M.; WANDERS, D.; PLAISANCE, E.P.; JUDD, R.L.; AKINGBEMI, B.T. Regulation of adiponectin secretion by soy isoflavones has implication for endocrine function of the testis. *Toxicology Letters*, 209(1):78-85, 2012.
- RENHE, I. R.T. O papel do leite na nutrição. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 63(363):36-43, 2008.
- RETANA-MÁRQUEZ, S.; HERNÁNDEZ, H.; FLORES, J. A.; MUÑOZ-GUTIÉRREZ, M.; DUARTE, G.; VIELMA, J.; FITZ-RODRÍGUEZ, G.; FERNÁNDEZ, I. G.; KELLER, M.; DELGADILLO, J.A. Effects of phytoestrogens on mammalian reproductive physiology. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15(1):129-145, 2012.

- RICART-JANÉ, D.; LLOBERA, M.; LÓPEZ-TEJERO, D. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the griess method. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, 6(2):178-185, 2002.
- ROBERTSON, K.M.; O'DONNELL, L.; SIMPSON, E.R.; JONES, M.E.E. The phenotype of the aromatase knockout mouse reveals dietary phytoestrogens impact significantly on testis function. *Endocrinology*, 143(9):2913-2921, 2015.
- ROOSEN-RUNGE, E.C.; GIESEL, L. O. Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. *The American Journal of Anatomy*, 87(1):1-30, 1950.
- ROOSEN-RUNGE, E. C. Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. *The Anatomical Record*, 123(4):385-398, 1955.
- RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R.A.; SINHA HIKIM, A.P.; CLEGG, E.D. Mammalian spermatogenesis. In: RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R. A.; SINHA HIKIM, A.P.; CLEGG, E.D. (Eds). Histological and histopathological evaluation of the testis. *Bolesta: Cache River Press*, 1-40, 1990.
- RUSSELL, L.D.; GRISWOLD, M.D. The Sertoli cell. (ed) Clearwater. *Cache River Press*, Florida, 1-37, 1993.
- SHERRILL, J.D.; SPARKS M.; DENNIS J.; MANSOUR, M.; KEMPPAINEN, B.W.; BARTOL, F.F.; MORRISON, E.E.; AKINGBEMI, B.T. Developmental exposures of male rats to soy isoflavones impact Leydig cell Differentiation1. *Biology of Reproduction*, 83(3):488-501, 2010.
- SRILATHA, B.; ADAIKAN, P.G. Oestrogen-androgen crosstalk in the pathophysiology of erectile dysfunction. *Asian Journal of Andrology*, 5(4):307-13, 2003.
- SETCHELL, K.D.; COLE, S.J. Variations in isoflavone levels in soy foods and soy protein isolates and issues related to isoflavone databases and food labeling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(14):4146-55, 2003.
- SETCHELL, K.D.R.; ZIMMER-NECHEMIAS, L.; CAI, J.; HEUBI, J.E. Exposure of infants to phyto-oestrogens from soy-based infant formula. *The Lancet*, 350:23-7, 1997.
- STRAUSS, L.; SANTTI, R.; SAARINEN, N.; STRENG, T.; JOSHI, S.; MÄKELÄ, S. Dietary phytoestrogens and their role in hormonally dependent disease. *Toxicology Letters*. 102-103:349-354, 1998.
- STROM, S.S.; YAMAMURA, Y.; DUPHORNE, C.M.; SPITZ, M.R.; BABAIAN, R.J.; PILLOW, P.C.; HURSTING, S.D. Phytoestrogen intake and prostate cancer: a case-control study using a new database. *Nutrition and Cancer*, 33:20-25, 1999.
- SWIERSTRA, E. E. Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar; duration of spermatozoan transit through the epididymis. *The Anatomical Record*, 161:171-186, 1968.
- VERNET, P.; AITKEN, R.J.; DREVET, J.R. Antioxidant strategies in the epididymis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 216:31-9, 2004.

- YAMAMOTO, N.; SHOJI, M.; HOSHIGAMI, H.; WATANABE, K.; WATANABE, K.; TAKATSUZU, T.; ASUDA, S.; IGOSHI, K.; KINOSHITA, H. Antioxidant capacity of soymilk yogurt and exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Bioscience Microbiota Food Health*, 38(3):97-104, 2019.
- YENEW, C.; TADELE, F.; MINUYE, B.; SISAY, E.; ASMAMAW, T.; MULATU, S.; & DEMISSIE, B. Raw cow milk nutritional content and microbiological quality predictors of South Gondar zone dairy farmers in Ethiopia. *Heliyon*, 8(10):1-6, 2022.
- ZHOU, J.R.; LI, L.; PAN, W. Dietary soy and tea combinations for prevention of breast and prostate cancers by targeting metabolic syndrome elements in mice. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 86(3):882S-888S, 2007.
- ZHOU, X.; DU, H.H.; JIANG, M.; ZHOU, C.; DENG, Y.; LONG, X.; ZHAO, X. Antioxidant Effect of *Lactobacillus fermentum* CQPC04-Fermented Soy Milk on D-Galactose-Induced Oxidative Aging Mice. *Frontiers in Nutrition*, 27(8):727467, 2021.
- ZHU, Y.; XU, H.; LI, M.; GAO, Z.; HUANG, J.; LIU, L.; HUANG, X.; LI, Y. Daidzein impairs Leydig cell testosterone production and Sertoli cell function in neonatal mouse testes: An in vitro study. *Molecular Medicine Reports*, 14(6):5325-5333, 2016.
- YILDIZ, F. Phytoestrogens in Functional Foods. *Taylor & Francis, Ltd*, 3(5):210-211, 2005.

## CAPÍTULO 3

---

### **Avaliação dos Efeitos do Consumo das bebidas Lácteas de Soja e Leite de Vaca nos Epidídimos de Camundongos Balb C Adultos**

**Amanda Alves Lozi<sup>1</sup>, Diane Costa Araujo<sup>1</sup>, Francielle de Fátima Viana Santana<sup>2</sup>, Maria Tatiana Soares Martins<sup>1</sup>, Mariáurea Matias Sarandy<sup>1</sup>, Reggiani Vilela Gonçalves<sup>2</sup>, Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo<sup>2</sup> and Sérgio Luis Pinto da Matta<sup>1</sup>**

*1-Department of General Biology, Federal University of Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil*

*2-Department of Animal Biology, Federal University of Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil*

#### **RESUMO**

O leite de vaca, muito consumido pelos seres humanos, vem sendo substituído por bebidas lácteas de soja, por ser uma alternativa para pessoas com intolerância a lactose e veganas. A soja (*Glycine max*), uma excelente fonte proteica, tem grande importância química e nutricional para o organismo, tendo em sua composição, uma variedade de compostos, dentre eles, as isoflavonas. As isoflavonas, são metabólitos secundários, que possuem estrutura química semelhante ao estrogênio, hormônio endógeno feminino. Porém, o consumo isoflavonas causa descontrole hormonal no organismo de animais experimentais (machos). Os órgãos do sistema reprodutor masculino trabalham em perfeita harmonia e os hormônios em níveis desejáveis são essenciais para seu funcionamento. Os epidídimos, órgãos importantes no sistema reprodutor, são responsáveis por receber os espermatozoides produzidos nos testículos através dos ductulos eferentes, para adquirirem motilidade e capacidade fecundante. Alterações nas funções desse órgão podem ser prejudiciais para a fertilidade. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito das bebidas lácteas de soja com grãos não transgênicos, transgênicos e leite de vaca no epidídimo de camundongos adultos. Foram utilizados 24 camundongos Balb C, divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais (n = 6 animais/grupo): O grupo 1 recebeu água destilada (controle), o grupo 2 recebeu bebida láctea de soja com grãos não transgênicos, o grupo 3 recebeu bebida láctea de soja com grãos transgênicos e grupo 4 recebeu leite de vaca, todos na dose de 0,7 mL, por gavagem, durante 42 dias. Ao final do tratamento (43º dia), os animais foram anestesiados e eutanasiados. Os epidídimos foram removidos, pesados, dissecados e processados para microscopia de luz e análises histomorfométricas. O peso corporal reduziu nos animais tratados com as bebidas lácteas de soja com grãos não transgênicos e transgênicos, quando comparados ao controle. O peso do epidídimo e os parâmetros histomorfométricos relacionados ao diâmetro de túbulo, de lume e altura de epitélio

de cada região do epididimo não sofreram alterações significativas em nenhum dos grupos tratados em relação ao controle. O tratamento com a bebida láctea de soja com grãos não transgênicos aumentou a proporção de patologias leves nos túbulos do segmento inicial, em relação ao controle. Já o tratamento com a bebida láctea de soja transgênica causou aumento nos túbulos com aumento de vacualização e redução dos túbulos normais do corpo do epidídimo, quando comparados ao controle. Os animais tratados com o leite de vaca não apresentaram nenhuma alteração significativa epididimária em relação ao controle. De acordo com os dados obtidos, no período e na dose testada, somente as bebidas lácteas de soja induziram alterações tubulares. Mesmo que poucas alterações tenham sido observadas, qualquer alteração na arquitetura do epidídimo possa ser uma resposta inicial aos efeitos que as bebidas lácteas de soja podem causar no órgão.

Palavras-chave: Reprodução masculina. Soja. Isoflavonas. Fitoestrógenos.

#### ABSTRACT

Cow's milk, widely consumed by humans, has been replaced by soy milk drinks, as it is an alternative for people with lactose intolerance and vegans. Soybean (*Glycine max*), an excellent protein source, has great chemical and nutritional importance for the body, having in its composition a variety of compounds, among them, isoflavones. Isoflavones are secondary metabolites, which have a chemical structure similar to estrogen, a female endogenous hormone. However, isoflavone consumption causes hormonal imbalance in the body of experimental animals (males). The organs of the male reproductive system work in perfect harmony and hormones at desirable levels are essential for their functioning. The epididymis, important organs in the reproductive system, are responsible for receiving the sperm produced in the testicles through the efferent ductules, to acquire motility and fertilizing capacity. Changes in the functions of this organ can be detrimental to fertility. Thus, the objective of this work was to evaluate the effect of soy milk drinks with non-transgenic grains, transgenic grains, and cow's milk in the epididymis of adult mice. Twenty-four Balb C mice were used, randomly divided into 4 experimental groups (n = 6 animals/group): Group 1 received distilled water (control), group 2 received soy milk drink with non-transgenic grains, group 3 received drink soy milk with transgenic grains and group 4 received cow's milk, all at a dose of 0.7 mL, by gavage, for 42 days. At the end of the treatment (43rd day), the animals were anesthetized and

ethanized. The epididymis were removed, weighed, dissected, and processed for light microscopy and histomorphometric analysis. Body weight decreased in animals treated with soy milk drinks with non-transgenic and transgenic grains when compared to the control. The weight of the epididymis and the histomorphometric parameters related to the diameter of the tubule, lumen, and epithelium height of each region of the epididymis did not undergo significant changes in any of the treated groups in relation to the control. Treatment with soy milk drink with non-transgenic grains increased the proportion of mild pathologies in the tubules of the initial segment, in relation to the control. The treatment with the transgenic soy milk drink caused an increase in the tubules with an increase in vacuolization and a reduction in the normal tubules of the body of the epididymis when compared to the control. The animals treated with cow's milk did not show any significant epididymal alteration in relation to the control. According to the data obtained, during the period and at the tested dose, only soy milk drinks induced tubular alterations. Even if few alterations were observed, any alteration in the architecture of the epididymis could be an initial response to the effects that soy milk drinks can cause in the organ.

Keywords: Male reproduction. Soy. Isoflavones. phytoestrogens.

## 1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max*), é um dos grãos mais cultivados no mundo para consumo humano e animal (Silva *et al.*, 2011; Sedyama *et al.*, 2015), possui muitas características químicas e nutricionais importantes para o organismo (Hasler, 1998; Setchell *et al.* 2011), sendo também, uma excelente fonte proteica (Wolf e Cowan, 1971; Sgarbieri *et al.*, 1981). Além da proteína, a soja fornece ácidos graxos e linolênico (Nawar, 1985) e algumas vitaminas (Franco, 1986). O consumo do leite de vaca é muito comum, por ser uma fonte proteica, porém a utilização de bebidas lácteas de soja, além de fornecer proteínas, ainda serve como alternativa para veganos e/ou pessoas que possuem intolerância à lactose (Casé *et al.*, 2005; Mollakhalili *et al.*, 2022). Entre os principais compostos presentes nas bebidas lácteas de soja estão as isoflavonas, formas mais comuns de fitoestrógenos (Kuiper *et al.*, 1997; Kuiper *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2014; Ziaei e Halaby, 2017). Os fitoestrógenos possuem estrutura semelhante à dos estrogênios produzidos pelos animais e, quando absorvidos, essa característica possibilita sua ligação aos receptores específicos destes hormônios endógenos (Navarro, 2005; Chen *et al.*, 2014; Ziaei e Halaby, 2017).

As isoflavonas podem atuar como os estrógenos, mas seus efeitos não são necessariamente idênticos, podendo causar alterações biológicas devido a sua atuação como desregulador endócrino (Eldridge, 1982; Fukutake *et al.*, 1996; Navarro, 2005; Yildiz, 2005) competindo com esteróides endógenos. Portanto, o equilíbrio entre a atividade estrogênica e antiestrogênica é determinado pela razão fitoestrógeno-estrógeno (Folman e Pope, 1966). Sabe-se que o aumento da exposição a estrógenos ou a fitoestrógenos perturba o ambiente hormonal durante o desenvolvimento fetal e pode estar associado ao aumento da incidência de anomalias reprodutivas masculinas (Bay *et al.*, 2006).

O sistema reprodutor masculino é composto pelos testículos, epidídimos e glândulas anexas (Russell *et al.*, 1990; Robaire *et al.*, 2006; Cornwall, 2009). Os epidídimos são órgãos importantes no sistema reprodutor, responsáveis por receber os espermatozoides produzidos nos testículos através dos ductulos eferentes, para adquirirem motilidade e capacidade fecundante (Sullivan, 2004; Shum *et al.*, 2009). O epidídimo é formado por um longo e único ducto enovelado e contorcido (Sullivan, 2004), sendo o epidídimo de murino dividido anatomicamente em quatro regiões principais: segmento inicial, cabeça, corpo e cauda (Hermo e Robaire, 2002; Cornwall, 2009). Cada região epididimária apresenta funções específicas, como absorção de fluidos vindos do testículo, processos iniciais e tardios de maturação espermática, armazenamento espermático e a fagocitose de espermatozoides anormais (Robaire e Viger, 1995; Cornwall, 2009). As funções desempenhadas pelo epidídimo são fundamentais para a manutenção de espermatozoides viáveis, qualquer alteração na sua morfologia, pode gerar dano funcional e como consequência, infertilidade (Kempinas *et al.*, 1998; Klinefelter, 2002)

Um conjunto crescente de evidências sugere que o consumo de isoflavonas da soja confere proteção contra carcinogênese em animais (Troll e Wiesner, 1983; Kennedy, 1995; Aldercreutz, 2002; Boutas *et al.*, 2022). Dados epidemiológicos relacionam à diminuição do risco de câncer de mama, próstata e cólon após o consumo da soja (Aldercreutz, 2002). As isoflavonas, presentes na soja, atuam como inibidores da carcinogênese, podendo ser utilizadas na quimioprevenção do câncer humano (Troll e Wiesner, 1983, Kennedy, 1995). Embora existam estudos que indicam os benefícios do consumo de soja na prevenção e tratamento do câncer, de mama e de próstata, da osteoporose e no controle hormonal em mulheres na menopausa (Troll e Wiesner, 1983; Kennedy, 1995; Aldercreutz, 2002; Messina, 2016; Applegate *et al.*, 2018; Boutas *et al.*, 2022), ainda não se sabe dos efeitos que ela pode causar no sistema reprodutor masculino (Faqi *et al.*, 2004). Há evidências de que o consumo de soja e seus derivados pode

causar danos no equilíbrio androgênico testicular (Guan *et al.*, 2008; Sherrill *et al.*, 2010; Akingbemi *et al.*, 2015; Lozi *et al.*, 2021), o que pode ocasionar a diminuição da produção e qualidade espermática, induzindo a redução da fertilidade (Carlsen *et al.*, 1992; Lozi *et al.*, 2021).

Divergências a respeito do consumo das isoflavonas da soja e sua ação no organismo são registradas, como a prevenção do câncer de próstata e a diminuição da testosterona, hormônio essencial para a produção espermática. Além disso, não existem trabalhos avaliando a ação das bebidas lácteas de soja com grãos não transgênicos, transgênicos e leite de vaca no epidídimo de animais experimentais. Com base nessas informações, este trabalho teve como objetivo avaliar, por meio de análises biométricas, histomorfométricas e histopatológicas, a ação das bebidas lácteas de soja com grãos não transgênicos, transgênicos e leite de vaca, no epidídimo de camundongos Balb C, adultos, após 42 dias de tratamento diário. Nossos resultados podem fornecer informações importantes sobre a ação destes compostos consumidos diariamente sobre a saúde reprodutiva masculina e auxiliar os tomadores de decisão nesta área sobre futuras pesquisas usando este modelo.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Animais**

Foram utilizados 24 camundongos Balb C adultos machos (36g e 50 dias de vida), obtidos do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram transportados em veículo com velocidade e temperatura controladas, sendo mantidos em período de adaptação por uma semana no Biotério Setorial do Departamento de Biologia Geral, onde o experimento foi realizado. Para definir o tamanho da amostra utilizamos o programa WinPepi, com um nível de significância de 5% e um grau de certeza de 10%, conferindo ao teste um poder de 90%. Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa, protocolo n° 01/2022.

### **2.2 Tratamento**

Os animais foram divididos, aleatoriamente, em quatro grupos experimentais (n = 6 animais/grupo). O grupo 1 (controle) recebeu água destilada, grupo 2 recebeu bebida láctea de soja com grãos não transgênicos, grupo 3 recebeu bebida láctea de soja com grãos transgênicos e grupo 4 recebeu leite de vaca, durante 42 dias, todos na dose de 0,7 mL, por gavagem. Os animais foram mantidos sob controle de luminosidade (12h claro/ 12h escuro) e temperatura (21°C ± 1) e receberam água e ração padrão *ad libitum*. A bebida láctea de soja com grãos não

transgênicos, transgênicos e o leite de vaca utilizadas foram de fabricação comercial, trocadas a cada três dias e mantidas sobre refrigeração durante todo o experimento. As tabelas nutricionais dos compostos utilizados estão representadas na Figura 1. O leite de vaca foi utilizado para comparação com as bebidas lácteas de soja, além de poderem possuir em sua constituição, isoflavonas da soja, devido a alimentação dos animais. A dose de 0,7 mL utilizada, foi baseada no valor máximo a ser administrado por gavagem para camundongos, levando em consideração o tamanho do seu estômago.

| A | <b>Informação Nutricional<br/>200ml (1 copo)</b> | <b>Quantidade por<br/>porção</b> | <b>%V.D.*</b> |
|---|--|----------------------------------|---------------|
|   | Valor Energético                                 | 69 kcal = 290 kJ                 | 3             |
|   | Carboidratos, dos quais:                         | 2,3 g                            | 1             |
|   | Açúcares, dos quais:                             | 0,9 g                            | **            |
|   | Lactose  | 0 g                              | **            |
|   | Proteínas  | 6,4 g                            | 9             |
|   | Gorduras totais, dos quais:                      | 3,6 g                            | 7             |
|   | Gorduras Saturadas                               | 0,7 g                            | 3             |
|   | Gorduras trans                                   | 0 g                              | **            |
|   | Gorduras Monoinsaturadas                         | 1,0 g                            | **            |
|   | Gorduras Poli-insaturadas                        | 1,7 g                            | **            |
|   | Colesterol                                       | 0 mg                             | **            |
|   | Fibra Alimentar                                  | 1,0 mg                           | 4             |
|   | Sódio  | 178 mg                           | 7             |
|   | Vitamina A                                       | 162 mcg                          | 27            |
|   | Vitamina D                                       | 2,8 mcg                          | 56            |
|   | Vitamina E                                       | 2,7 mg                           | 27            |
|   | Vitamina B6                                      | 0,22 mg                          | 17            |
|   | Ácido Fólico                                     | 36 mcg                           | 15            |
|   | Vitamina B12                                     | 1,2 mcg                          | 50            |
|   | Cálcio   | 264 mg                           | 26            |
|   | Zinco  | 1,1 mg                           | 16            |

| B | <b>Informação Nutricional<br/>200ml (1 copo)</b> | <b>Quantidade por<br/>porção</b> | <b>%V.D.*</b> |
|---|--|----------------------------------|---------------|
|   | Valor Energético                                 | 95 kcal = 399 <u>kJ</u>          | 5             |
|   | Carboidratos                                     | 12 g                             | 4             |
|   | Açúcares   | 12 g                             | **            |
|   | Lactose  | 0 g                              | **            |
|   | Proteínas  | 5,4 g                            | 7             |
|   | Gorduras Totais                                  | 2,9 g                            | 5             |
|   | Gorduras Saturadas                               | 1,7 g                            | 8             |
|   | Gorduras Trans                                   | 0                                | **            |
|   | Fibra alimentar                                  | 0,8 g                            | 4             |
|   | Sódio  | 95 mg                            | 4             |
|   | Cálcio   | 240 mg                           | 24            |

| C | <b>Informação Nutricional<br/>200ml (1 copo)</b> | <b>Quantidade por<br/>porção</b> | <b>%V.D.*</b> |
|---|--|----------------------------------|---------------|
|   | Valor energético                                 | 126 kcal = 529 <u>kJ</u>         | 6             |
|   | Carboidratos                                     | 10g                              | 3             |
|   | Proteínas  | 7,0g                             | 9             |
|   | Gorduras totais                                  | 6,4g                             | 12            |
|   | Gorduras saturadas                               | 4,0                              | 18            |
|   | Sódio  | 120 mg                           | 5             |
|   | Cálcio   | 240mg                            | 24            |

**Figura 1** – Bebidas lácteas de soja e leite de vaca utilizados para tratamento dos animais experimentais. A- Bebida láctea de soja com grãos não transgênicos (Ingredientes: Água, grãos de soja, minerais (cálcio e zinco), maltodextrina, sal, vitaminas (E, B6, A, ácido fólico, D e B12), aromatizante, estabilizantes: citrato de sódio, goma gelana e goma xantana, emulsificante lecitina de soja e edulcorante sucralose. B- Bebida láctea de soja com grãos transgênicos

(Ingredientes: Água, grãos de soja, açúcar, minerais (cálcio e zinco), sal, vitaminas (E, B6, A, ácido fólico, D e B12), aromatizante, estabilizantes: citrato de sódio, goma gelana e goma xantana, emulsificante lecitina de soja e edulcorante sucralose) C- Leite de vaca (Leite Pasteurizado Integral).

### **2.3 Coleta de amostras, biometria corporal e do epidídimo**

Ao final do tratamento, os animais foram pesados e anestesiados com tiopental 30mg/Kg via intraperitoneal. Após a etapa de anestesia, foi realizada a coleta do sangue por meio de punção cardíaca, que acarretou na morte do animal por exsanguinação. Os epidídimos foram removidos, dissecados, pesados e preparados para a realização das análises. De posse dos pesos corporais e epididimários, foi calculado o índice epididimossomático (IES) a partir da equação  $IES = (\text{peso dos epidídimos}/\text{peso corporal}) \times 100$ . O peso relativo do epidídimo foi calculado a partir da divisão do Peso do Órgão (PO) pelo Peso Corporal (PC) e multiplicado por 100 ( $PO / PC \times 100$ ). Os animais foram pesados semanalmente durante todo o experimento. A variação do peso inicial (PI) e final (PF) foram comparados entre os animais experimentais ( $PI - PF = \text{Variação}$ ).

### **2.4 Processamento do material histológico para microscopia de luz**

Os epidídimos foram fixados em solução Karnovsky por 48h (Karnovsky, 1965), permanecendo em álcool 70% até o processamento histológico. Os fragmentos foram desidratados em séries crescentes de etanol (80, 90 e 100%) e incluídos em historesina (Historesin®, Leica Microsystems, Nussloch, Alemanha). Secções histológicas de 3 µm de espessura foram obtidas para as análises histopatológicas e morfométricas. Para a obtenção dessas secções, foi utilizado micrótomo rotativo (RM 2255, Leica Biosystems, Nussloch, Alemanha). As secções histológicas foram semisseriadas, utilizando um a cada nove cortes, para evitar analisar a mesma área, e coradas com azul de toluidina/borato de sódio 1%. As lâminas foram montadas com Entellan® (Merck, Frankfurt, Alemanha), fotografadas em microscópio Olympus AX-70 e analisadas utilizando-se o software Image J ® versão 1.53a (National Institutes of Health, Rockville, MD, EUA)

### **2.5 Avaliação histomorfométrica do epidídimo**

Para as análises histomorfométricas do diâmetro tubular, de lume e da altura do epitélio, foram obtidas imagens de cada região do epidídimo (segmento inicial, cabeça, corpo e cauda),

utilizando microscópio de luz (Olympus BX53, Tokyo, Japan) equipado com câmera digital (Olympus DP73, Tokyo, Japan) e analisadas com o *software* Image J. Todas as imagens foram obtidas em objetiva de 10x, zoom 2. A média do diâmetro tubular de cada região, por animal, foi obtida mensurando aleatoriamente 20 secções transversais tubulares, tão circulares quanto possível. A altura de epitélio de cada túbulo por região foi obtida medindo aleatoriamente 20 secções transversais tubulares da lâmina própria ao lume, utilizando-se a média de quatro medidas diametralmente opostas. Para calcular o diâmetro luminal, o diâmetro tubular foi subtraído pela média das duas alturas de epitélio (Souza *et al.*, 2016).

## 2.6 Avaliação histopatológica

As preparações histológicas do epidídimo, foram observadas no microscópio de luz para identificação de alterações histopatológicas. A análise de histopatologia foi realizada de acordo com a metodologia modificada de Vogt *et al.*, (2021) e De Grava & Klinefelter (2014), na qual as histopatologias foram divididas em níveis, definidos da seguinte forma: Normal - Túbulos normais, Patologia Leve - Túbulos com vacuolização epitelial e vacuolização lipídica espumosa), Patologia moderada - Túbulos com alterações cribiformes e descamação, e Patologia Grave - Túbulos com células germinativas no lúmen do epidídimo e presença de infiltrados inflamatórios. Foram analisados e contados 100 túbulos de cada região do epidídimo (segmento inicial, cabeça, corpo e cauda) por animal. Além disso, oito cortes de cada região por animal foram avaliados para verificar a presença de infiltrados inflamatórios.

## 2.7 Análise antioxidante (Sequestro por DPPH)

Para avaliar a capacidade antioxidante das bebidas lácteas de soja com grãos não transgênicos, transgênicos e do leite de vaca, foi utilizada a técnica do sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), metodologia descrita por Falcão *et al.*, (2006). A análise é feita medindo a capacidade inibitória de compostos quanto à ação de radicais livres, através do decréscimo da absorbância do meio de reação (Kim *et al.*, 2002). A atividade antioxidante é avaliada pela redução do radical DPPH formando difinenil-picril-hidrazina, um composto de coloração amarelada em uma reação que é estabilizada após 30 minutos do seu início (Brand-Williams *et al.*, 1995). Uma curva-padrão de absorbância de DPPH foi realizada e outra para padrão/controle. Para atividade antioxidante utilizou-se butilhidroxitolueno (BHT), ácido ascórbico (vitamina C) e rutina nas concentrações de 200, 175, 150, 125, 100, 75 e 50 µg/ml, diluídos em metanol. A cada concentração das bebidas lácteas de soja e do leite de vaca (200

$\mu\text{L}$ ) ou de BHT/vitamina C/rutina acrescentou-se 180  $\mu\text{L}$  de DPPH, fazendo a leitura em leitor de microplaca a 517 nm, imediatamente após a mistura (Tempo 0) e após 30 minutos (Tempo 30) de reação. A porcentagem de inibição dos radicais DPPH foi calculada através da fórmula abaixo:

$$\text{Inibição do DPPH (\%)} = \frac{\text{Abs DPPH/metanol 80\%} - \text{Abs compostos}}{\text{Abs DPPH/metanol 80\%}} \times 100$$

A curva padrão foi preparada com uma solução de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8- tetrametil-2-ácido carboxílico) em diferentes concentrações, sendo os resultados expressos em  $\mu\text{moles}$  equivalentes de Trolox/200 mL de amostra. As análises foram realizadas em triplicatas.

## **2.8 Análises estatísticas**

Os parâmetros foram submetidos à avaliação de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e, em seguida, foi feita análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman-Keuls (SNK). Foi utilizado o software STATISTICA, sendo o nível de significância considerado de  $p \leq 0,05$ . Todos os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

## **3. RESULTADOS**

### **3.1 Biometria corporal e epididimal**

Os parâmetros biométricos, corporal e epididimário, de camundongos Balb C adultos expostos a bebidas lácteas de soja com grãos não transgênicos, transgênicos e de vaca, durante 42 dias, estão descritos na Tabela 1. Observou-se que durante o período experimental, os animais tratados com as bebidas lácteas de soja tiveram menor variação do peso, quando comparados os pesos iniciais e finais dos animais, em relação ao resultado da variação do grupo tratado com leite de vaca e do grupo controle. Alterações no peso do epidídimo e peso relativo do epidídimo não foram observadas em nenhum dos grupos tratados em relação ao controle.

**Tabela 1** – Parâmetro biométrico corporal e epididimário dos camundongos Balb C adultos expostos a bebidas lácteas de soja com grãos não transgênicos (NT), transgênicos (T) e leite de vaca, durante 42 dias.

| Parâmetros (g) /<br>Dias de tratamento | Controle      | Bebida láctea<br>de Soja (NT) | Bebida láctea<br>de Soja (T) | Leite de vaca |
|--|---------------|-------------------------------|------------------------------|---------------|
| PC / 0                                 | 34,50 ± 2,98  | 31,61 ± 2,72                  | 31,81 ± 2,94                 | 33,70 ± 2,22  |
| PC / 7                                 | 32,60 ± 3,12  | 30,54 ± 2,94                  | 29,63 ± 2,80                 | 32,76 ± 2,12  |
| PC / 14                                | 32,30 ± 3,40  | 30,73 ± 2,43                  | 29,27 ± 3,43                 | 33,57 ± 2,26  |
| PC / 21                                | 34,03 ± 2,48  | 31,17 ± 2,47                  | 30,51 ± 2,66                 | 33,67 ± 1,90  |
| PC / 28                                | 34,63 ± 2,19  | 31,54 ± 2,20                  | 30,78 ± 2,40                 | 33,92 ± 2,00  |
| PC / 35                                | 35,79 ± 2,52  | 32,19 ± 2,33                  | 31,18 ± 2,49                 | 35,04 ± 1,78  |
| PC / 42                                | 36,17 ± 2,89  | 32,14 ± 2,60*                 | 32,12 ± 3,03*                | 35,49 ± 2,22  |
| PE / 42                                | 0,06 ± 0,01   | 0,06 ± 0,01                   | 0,06 ± 0,01                  | 0,06 ± 0,01   |
| PRE / 42                               | 63,80 ± 14,79 | 82,24 ± 19,52                 | 64,59 ± 7,93                 | 60,36 ± 5,04  |

PC – Peso Corporal; PE – Peso do Epidídimo; PRE – Peso Relativo do Epidídimo. Dose única diária e exposição crônica (n = 6). Dados expressos como média ± DP. \* mostram valores significativamente diferentes na mesma linha, em relação ao controle ( $p \leq 0,05$ ) (Student Newman Keuls).

### 3.2 Histomorfometria epididimal

Os parâmetros histomorfométricos epididimários de camundongos Balb C adultos expostos a bebida láctea de soja com grãos não transgênicos, transgênicos e de vaca, durante 42 dias, estão descritos na Tabela 2. Nenhuma alteração significativa foi encontrada no diâmetro de túbulo, de lume e na altura do epitélio das regiões epididimárias dos animais tratados com as bebidas lácteas de soja e leite de vaca em relação ao controle.

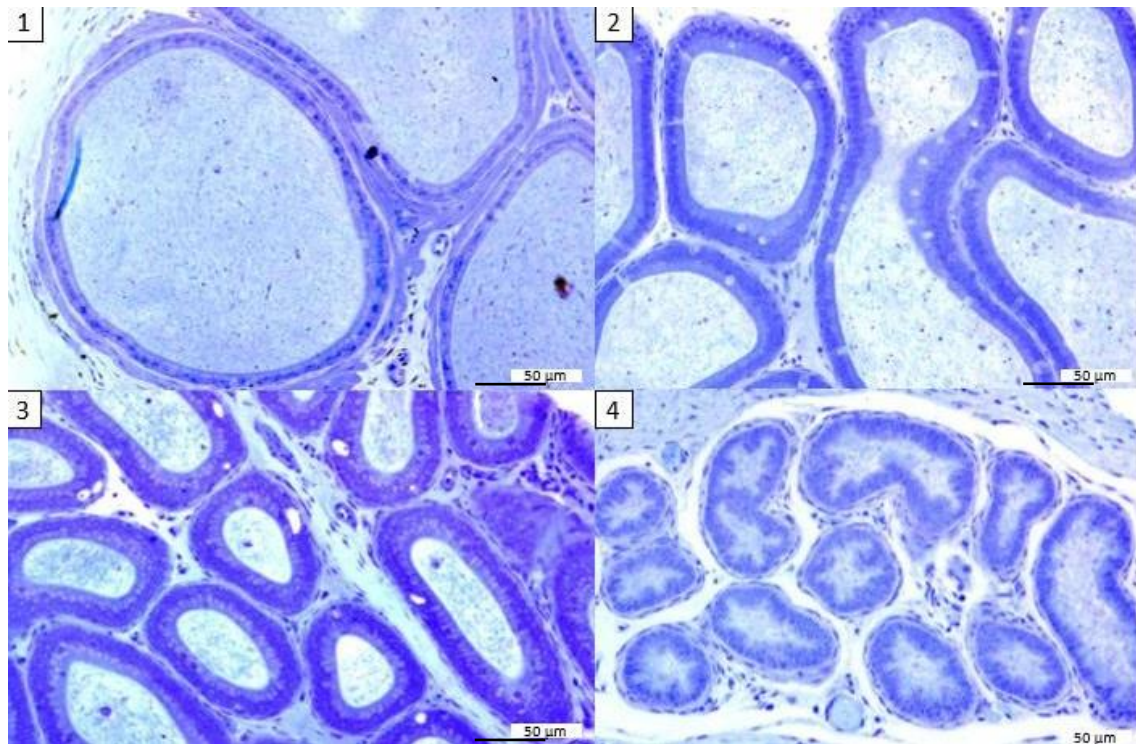
**Tabela 2** - Histomorfometria do epidídimo de camundongos Balb C adultos expostos a bebidas lácteas de soja com grãos não transgênicos (NT), transgênicos (T) e leite de vaca, durante 42 dias.

| <b>Parâmetros</b>       | <b>Controle</b> | <b>Bebida láctea de Soja (NT)</b> | <b>Bebida láctea de Soja (T)</b> | <b>Leite de vaca</b> |
|-------------------------|-----------------|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------|
| <u>Segmento Inicial</u> |                 |                                   |                                  |                      |
| Altura epitélio         | 34,83 ± 3,66    | 33,17 ± 4,62                      | 34,50 ± 2,59                     | 33,17 ± 2,48         |
| Diâmetro túbulo         | 125,00 ± 10,02  | 126,67 ± 5,01                     | 115,33 ± 13,13                   | 116,67 ± 8,78        |
| Diâmetro Lume           | 55,33 ± 11,15   | 60,33 ± 8,48                      | 46,33 ± 13,62                    | 50,33 ± 11,38        |
| <u>Cabeça</u>           |                 |                                   |                                  |                      |
| Altura epitélio         | 38,67 ± 4,68    | 36,00 ± 4,47                      | 43,17 ± 8,28                     | 31,83 ± 4,26         |
| Diâmetro túbulo         | 150,33 ± 11,13  | 150,17 ± 10,61                    | 149,50 ± 9,22                    | 150,33 ± 8,52        |
| Diâmetro Lume           | 73,00 ± 12,38   | 78,17 ± 18,43                     | 63,17 ± 17,61                    | 86,67 ± 11,57        |
| <u>Corpo</u>            |                 |                                   |                                  |                      |
| Altura epitélio         | 31,50 ± 4,14    | 31,00 ± 2,76                      | 28,33 ± 2,07                     | 32,50 ± 13,35        |
| Diâmetro túbulo         | 204,50 ± 19,49  | 194,17 ± 17,47                    | 192,17 ± 21,28                   | 238,83 ± 101,91      |
| Diâmetro Lume           | 141,50 ± 22,75  | 132,17 ± 19,05                    | 135,50 ± 20,63                   | 173,83 ± 76,80       |
| <u>Cauda</u>            |                 |                                   |                                  |                      |
| Altura epitélio         | 29,83 ± 5,12    | 26,00 ± 4,34                      | 27,00 ± 6,26                     | 21,50 ± 3,39         |
| Diâmetro túbulo         | 321,00 ± 23,41  | 317,50 ± 28,47                    | 332,17 ± 42,97                   | 319,67 ± 15,38       |
| Diâmetro Lume           | 261,33 ± 30,85  | 265,50 ± 29,32                    | 278,17 ± 49,72                   | 276,67 ± 15,96       |

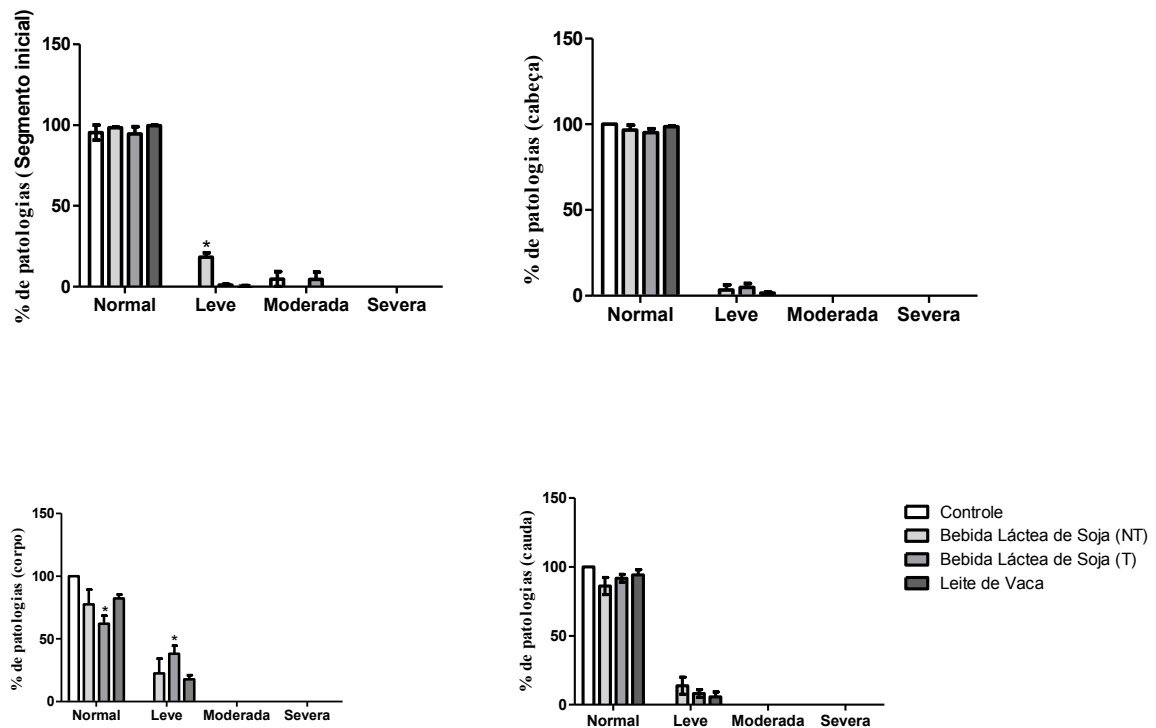
Dose única diária, exposição crônica (n = 6). Dados expressos como média ± DP. \* mostram valores significativamente diferentes na mesma linha, em relação ao controle ( $p \leq 0,05$ ) (Student Newman Keuls).

### 3.3 Avaliação histopatológica epididimal

A histopatologia do epidídimo de camundongos Balb C adultos expostos a bebidas lácteas de soja com grãos não transgênicos, transgênicos e de vaca, durante 42 dias, está representada nas Figuras 2 e 3. Houve surgimento de patologias leves apenas no seguimento inicial do grupo tratado com a bebida láctea de soja com grãos não transgênicos, quando comparadas ao controle. Na região da cabeça do epidídimo nenhuma alteração histopatológica foi observada nos grupos tratados em relação ao controle. Entretanto, no corpo do epidídimo houve o surgimento de patologias leves e diminuição de túbulos normais no do grupo tratado com a bebida láctea de soja transgênico, quando comparado ao grupo controle. Por fim, nenhuma alteração histopatológica significativa foi observada nos animais tratados com as bebidas lácteas e leite de vaca na cauda do epidídimo, quando comparados ao controle.



**Figura 2** - Histopatologia do epidídimo de camundongos Balb C adultos expostos a bebidas lácteas de soja com grãos não transgênicos, transgênicos e leite de vaca, durante 42 dias. 1- Túbulos normais (cauda), 2- Túbulos com vacuolização lipídica espumosa (corpo), 3- Túbulos com vacuolização epitelial (cabeça) e 4- Túbulos com alterações cribiformes e descamação (cabeça). Corte de 3 µm corado com azul de toluidina. Barras = 50µm.



**Figura 3:** Avaliação histopatológica do epidídimo de camundongos Balb C após ingestão por gavagem de bebidas lácteas de soja com grãos não transgênicos (NT), transgênicos (T) e leite de vaca, durante 42 dias. Dose única diária, exposição crônica (n = 6). Dados expressos como média  $\pm$  DP. \* mostram valores significativamente diferentes, em relação ao controle ( $p \leq 0,05$ ) (Student Newman Keulsc).

### 3.4 Análise antioxidante (Sequestro por DPPH)

As bebidas lácteas de soja com grãos não transgênicos, transgênicos e leite de vaca não tiveram uma taxa alta de sequestro por DPPH. Os resultados obtidos dos os compostos as bebidas lácteas de soja e o leite de vaca foram comparados com os antioxidantes comerciais BHT, ácido ascórbico e rutina, mostrando que os compostos testados não possuem atividade antioxidante.

## 4. DISCUSSÃO

Este trabalho é pioneiro na avaliação das bebidas lácteas de soja com grãos não transgênicos, transgênicos e leite de vaca sobre o epidídimo de camundongo Balb C adultos, por 42 dias. Na literatura, poucos estudos avaliam o efeito do consumo da soja no desenvolvimento e na função epididimária. Existem muitos desafios para entender seus riscos e benefícios da soja e seus compostos para a saúde reprodutiva masculina (Cederroth *et al.*,

2012). O epidídimo é dividido em regiões, cada uma delas apresentando funções específicas (Robaire e Viger, 1995; Cornwall, 2009). Alterações nas regiões epididimárias podem levar ao descontrole nas funções e como consequência, diminuição da fertilidade (Kempinas *et al.*, 1998; Klinefelter, 2002). Neste trabalho foi observado que o consumo do leite de vaca por 42 dias consecutivos não provocou alterações significativas no epidídimo. Por outro lado, as bebidas lácteas de soja com grãos não transgênicos e transgênicos causaram diminuição do peso corporal, aumento de vacúolos no epitélio e diminuição de túbulos normais do epidídimo.

Neste trabalho, a variação da biometria corporal inicial e final sofreu redução nos grupos tratados com as bebidas lácteas de soja não transgênica e transgênica, permanecendo inalteradas nos animais tratados com leite de vaca. Já os pesos total e relativo do epidídimo não sofreram alterações em nenhum dos grupos tratados. O peso corporal, em condições experimentais, fornece informações importantes sobre a ação de um composto no organismo (Fernandez *et al.*, 2008). A redução do peso corporal de animais em período de experimentação, vivendo dentro das mesmas condições, traz informações importantes sobre o composto que está sendo testado. Compostos testados em animais podem gerar reações adversas e a redução do peso corporal pode ser uma delas. Segundo Dubuc (1976), a redução do peso corporal é normal em animais tratados com estrógeno. Na literatura, a redução do peso corporal também foi observada em animais tratados com a genisteína na dose de 5 mg/kg por 130 dias (Roberts *et al.*, 2000) e 1250 mg/L por 50 dias Delclos *et al.*, 2001), também com agênisteína e daidzeína nas doses de 150, 300 e 600 mg/kg por 84 dias (Guan *et al.*, 2008) e na dose de 200 mg/kg por 90 dias (Piotrowska *et al.*, 2011). Nagao *et al.*, (2001), também relataram redução do peso corporal em ratos machos e fêmeas expostos a genisteína. Weber *et al.*, (2001) testaram o efeito de uma dieta rica em isoflavonas (600 µg/g) durante 5 semanas em ratos, demonstrando que níveis altos de isoflavonas em um tempo relativamente curto, pode resultar em diminuição do peso corporal. Em relação ao leite de vaca, Ganmaa *et al.* (2004) avaliaram o efeito do seu consumo em ratos Wistar (24 machos e 24 fêmeas) durante quatro semanas, observando que o leite não tem efeito negativo em nenhum dos parâmetros avaliados, como peso corporal e epididimário. Na literatura, raramente se discute sobre os efeitos do leite de vaca devido a dificuldade em avaliar a quantidade de leite que um indivíduo consome durante sua vida e pela variedade de alimentos derivados dele (Ganmaa *et al.*, 2004). Todos os animais receberam além da dieta padrão, os compostos testados, a diminuição na variação do peso corporal pode ter ocorrido devido a diminuição da absorção de colesterol induzido pelo consumo da bebida láctea de soja (Normén *et al.*, 200). Tratamentos com uma dose e período maior de exposição poderiam trazer mais

informações a respeito dos efeitos causados pelo consumo dos compostos testados.

A bebida láctea de soja é uma fonte rica em nutrientes, porém, apresenta substâncias nocivas como alérgenos, fatores antinutricionais e aminas, que podem ser prejudiciais à saúde (Mollakhalili *et al.*, 2022). No presente estudo, não foram observadas alterações histomorfométricas epididimárias relacionadas ao diâmetro do túbulo, lume e altura do epitélio nas regiões avaliadas em nenhum dos grupos tratados. Corrêa *et al.*, (2017), encontraram resultados similares em ratos Wistar tratados com semente de linhaça, substância rica em isoflavonas. O fato de não ter ocorrido nenhuma alteração nos parâmetros histomorfométricos, pode estar relacionado a dose, idade dos animais e tempo de exposição, pois, segundo Cederroth *et al.* (2012), muitos efeitos reprodutivos podem se manifestar anos ou até mesmo décadas após a exposição inicial a tais substâncias.

O epidídimo é um órgão importante na maturação espermática (Cornwall, 2009) e o estrogênio tem um papel essencial durante o processo (Hess *et al.*, 2001). Alterações nos mecanismos que levam ao bom funcionamento do epidídimo podem trazer complicações para a fertilidade (Kempinas *et al.*, 1998; França *et al.*, 2005). Neste estudo, foram encontradas patologias leves, como vacuolização no segmento inicial no grupo tratado com a bebida láctea de soja com grãos não transgênicos e no corpo apenas no grupo tratado com a bebida láctea de soja com grãos transgênicos. A diminuição de túbulos normais na região do corpo também foi observada no grupo tratado com a bebida láctea de soja transgênica. Nas regiões de cabeça e cauda não foram observadas alterações em nenhum dos grupos tratados. De acordo com Creasy (2001), pequenos segmentos epididimários podem apresentar aumentos de vacuolização sem trazer grandes prejuízos para o órgão, porém, devem ser a única patologia a ser observada para que a fertilidade não seja prejudicada. Resultados semelhantes foram encontrados por Ganmaa *et al.*, (2004) em ratos Wistar tratados com leite de vaca e por Nagao *et al.*, (2001) em ratos tratados com genisteína. Lee *et al.*, (2004), em um estudo com camundongos adultos (6 meses), tratados (gavagem) com dieta a base de soja, durante cinco semanas, também não apresentaram histopatologias no epidídimo, indicando que a ingestão de isoflavonas na fase adulta pode não afetar o sistema reprodutor masculino. No presente estudo, poucas alterações histopatológicas epididimárias foram encontradas, entendendo-se que o período de tratamento, a idade dos animais e a dose administrada podem ter sido insuficientes para mais efeitos se tornarem aparentes.

A atividade antioxidante das bebidas lácteas de soja com grãos não transgênicos, transgênicos e leite de vaca foi avaliada e não foi satisfatória, quando comparadas a

antioxidantes comerciais conhecidos (BHT, ácido ascórbico e rutina). A bebida láctea de soja fermentado possui uma atividade antioxidante significativa, uma vez que, os microorganismos que fazem da fermentação também produzem antioxidantes (Zhou *et al.*, 2021). Os *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus pentosaceus* MYU 759 e *L. plantarum* promovem a conversão de isoflavonas em agliconas e proteínas em peptídeos, aumentando sua ação contra radicais livres (Yamamoto *et al.*, 2019; Hwang *et al.*, 2021). Neste trabalho não utilizamos bebidas lácteas de soja e leite de vaca fermentados, nem foi adicionado antioxidantes nos compostos testados, devido a isso, não apresentaram atividade antioxidante.

## 5. CONCLUSÕES

O tratamento com as bebidas lácteas de soja com grãos não transgênicos e transgênicos em camundongos Balb C adultos, no período de 42 dias, resultou em diminuição na variação do peso corporal, surgimento de vacuolização e redução dos túbulos normais do segmento inicial e corpo do epidídimo. De acordo com os dados obtidos, poucas alterações no epidídimo foram observadas, embora, qualquer alteração em sua arquitetura pode ser uma resposta inicial aos efeitos que as bebidas lácteas de soja e leite de vaca podem causar no órgão. Entretanto, mais análises são necessárias, como avaliação do status oxidativo epididimário. Novos estudos com período maior de tratamento, diferentes doses, compostos isolados e a utilização de animais mais jovens também são indicados, esclarecendo o efeito dos compostos testados no epidídimo.

## 6. REFERÊNCIAS

- ALDERCREUTZ, H. Phytoestrogens and cancer. *Lancet Oncology*, 3(6):364-373, 2002.
- AKINGBEMI, B.T.; BRADEN, T.D.; KEMPPAINEN, B.W.; HANCOCK, K.D.; SHERRILL, J.D.; COOK, S.J.; HE, X.; SUPKO, J.G. Exposure to Phytoestrogens in the Perinatal Period Affects Androgen Secretion by Testicular Leydig Cells in the Adult Rat. *Endocrinology*, 148(9):4475-4488, 2015.
- APPLEGATE, C.C.; ROWLES, J.L.; RANARD, K.M.; JEON, S.; ERDMAN, J.W. Soy Consumption and the Risk of Prostate Cancer: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*, 10(1):40, 2018.
- BAY, K.; ASKLUND, C.; SKAKKEBAEK, N.E.; ANDERSSON, A.M. Testicular dysgenesis syndrome: possible role of endocrine disrupters. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism*, 20:77-90, 2006.
- BOUTAS, I.; KONTOGEORGI, A.; DIMITRAKAKIS, C.; KALANTARIDOU, S.N. Soy Isoflavones and Breast Cancer Risk: A Meta-analysis. *In Vivo*, 36(2):556-562, 2022.
- CARLSEN, E.; GIWERCMAN, A.; KEIDING, N.; SKAKKEBAEK, N.E. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ Journals*, 305:609-613, 1992.
- CEDERROTH, C.R.; ZIMMERMANN, C.; NEF, S. Soy, phytoestrogens and their impact on reproductive health. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 355(2):192-200, 2012.
- CASÉ, F.; DELIZA, R.; ROSENTHAL, A. Produção de leite de soja enriquecido com cálcio. *Food Science and Technology*, 25:86-91, 2005.
- CHEN, M.; RAO, Y.; ZHENG, Y.; WEI, S.; LI, Y.; GUO, T.; YIN, P. Association between soy isoflavone intake and breast cancer risk for pre- and post-menopausal women: a meta-analysis of epidemiological studies. *PLoS One*, 9(2):e89288, 2014.
- CORNWALL, G.A. New insights into epididymal biology and function. *Human Reproduction Update*, 15:21-27, 2009.
- CORRÊA, L.B.; CARDOZO, L.F.D.; F., RIBEIRO, I.C.D.A.; BOAVENTURA, G.T.; CHAGAS, M.A. Influence of prolonged flaxseed (*Linum usitatissimum*) consumption over epididymis and testicle histoarchitecture of Wistar rats. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 37(6):650-656, 2017.
- CREASY, D.M. Pathogenesis of Male Reproductive Toxicity. *Toxicologic Pathology*. 29(1):64-76, 2001.
- DELCLOS, K.B.; BUCCI, T.J.; LOMAX, L.G.; LATENDRESSE, J.R.; WARBRITTON, A., WEIS, C.C.; NEWBOLD, R.R. Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD (Sprague-Dawley) rats. *Reproductive Toxicology*, 15(6):647-663, 2001.
- DE GRAVA, K.W.; KLINEFELTER, G.R. Interpreting histopathology in the epididymis. *Spermatogenesis*, 4(2):979114, 2014.

- DUBUC, P.U. Prepubertal estrogen treatment and somatic growth in rats. *Endocrinology*, 98:623-9, 1976.
- ELDRIDGE, A.C. Determination of isoflavones in soybean flours, protein concentrates, and isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(2):353-355, 1982.
- FAQI, A.S.; JOHNSON, W.D.; MORRISSEY, R.L.; MCCORMICK, D.L. Reproductive toxicity assessment of chronic dietary exposure to soy isoflavones in male rats. *Reproductive Toxicology*, 18(4):605-611, 2004.
- FERNANDEZ, C.D.B.; PORTO, E.M.; ARENA, A.C.; KEMPINAS, W.G. Effects of altered epididymal sperm transit time on sperm quality. *International Journal of Andrology*, 31:427-437, 2008.
- FOLMAN, Y.; POPE, G.S. The interaction in the immature mouse of potent oestrogens with coumestrol, genistein and other uterovaginitrophic compounds of low potency. *Journal of Endocrinology*, 34:215-218, 1966.
- FRANÇA, L.R.; AVELAR, G.F.; ALMEIDA, F.F. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*, 63(2):300-18, 2005.
- FRANCO, G. Tabela de composição química de alimentos. 7ª ed. Rio de Janeiro: Ed. *Livraria Atheneu*, 1986.
- FUKUTAKE, M.; TAKAHASHI, M.; ISHIDA, K.; KAWAMURA, H.; SUGIMURA, T.; WAKABAYASHI, K. Quantification of genistein and genistin in soybeans and soybean products. *Food and Chemical Toxicology*, 34(5):457-461, 1996.
- GANMAA, D.; QIN, L.Q.; WANG, P.Y.; TEZUKA, H., TERAMOTO, S; SATO, A. A two-generation reproduction study to assess the effects of cows' milk on reproductive development in male and female rats. *Fertility and Sterility*, 82:1106-1114, 2004.
- GUAN, L.; HUANG, Y.; CHEN, Z.Y. Developmental and reproductive toxicity of soybean isoflavones to immature SD rats. *Biomedical and Environmental Sciences*, 21(3):197-204, 2008.
- HASLER, C.M. Functional Foods: Their Role in Disease Prevention and Health Promotion. *Food Technology*, 52(11), 1998.
- HERMO L, ROBAIRE B. Epididymal cell types and their functions. In: Robaire B, Hinton BT, editors. The Epididymis- from molecules to clinical practice. *New York: Kluwer Academic/Plenum Publisher*, 81-102, 2002.
- HESS, R.A.; BUNICK, D.; BAHR, J. Oestrogen, its receptors and function in the male reproductive tract – review. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 178(1-2):29-38, 2001.
- HWANG, C.E.; KIM, S.C.; KIM, D.H.; LEE, H.Y.; SUH, H.K.; CHO, K.M.; LEE, J.H. Enhancement of isoflavone aglycone, amino acid, and CLA contents in fermented soybean yogurts using different strains: Screening of antioxidant and digestive enzyme inhibition properties. *Food Chemistry*, 340:128199, 2021.

- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 27:137A, 1965.
- KENNEDY, A.R. The evidence for soybean products as cancer preventive agents. *Journal of Nutrition*, 125(3):733S-743S, 1995.
- KEMPINAS, W.G.; SUAREZ, J.D.; ROBERTS, N.L.; STRADER, L.; FERRELL, J.; GOLDMAN, J.M.; KLINEFELTER, G.R. Rat epididymal sperm quantity, quality and transit time after guanethidine-induced sympathectomy. *Biology Reproduction*. 59:890-896, 1998.
- KLINEFELTER, G.R. Actions of toxicants on the structure and function of the epididymis. In: 29 Robaire B, Hinton BT, editors. *The Epididymis – from molecules to clinical practice*. 30 New York: Kluwer Academic/ Plenum Publisher, 353-369, 2002.
- KUIPER, G.G.; CARLSSON, B.O.; GRANDIEN, K.A.J.; ENMARK, E., HÄGGBLAD, J.; NILSSON, S.; & GUSTAFSSON, J.A. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Endocrinology*, 138(3):863-870, 1997.
- KUIPER, G.G.; LEMMEN, J.G.; CARLSSON, B.O.; CORTON, J.C.; SAFE, S.H.; VAN DER SAAG, P.T.; & GUSTAFSSON, J.A. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor  $\beta$ . *Endocrinology*, 139(10):4252-4263, 1998.
- LEE, B.J.; KANG, J.K.; JUNG, E.Y.; YUN, Y.W.; BAEK, I.J.; YON, J.M.; NAM, S.Y. Exposure to genistein does not adversely affect the reproductive system in adult male mice adapted to a soy-based commercial diet. *Journal of Veterinary Science*, 5(3):227- 234. 2004.
- LOZI, A.A.; DA MATTA, S.L.; SARANDY, M.M.; DE MELO, F.C.S.A.; ARAUJO, D.C; NOVAES, R.D.; GONÇALVES, R.V. Relevance of the Isoflavone Absorption and Testicular Function: A Systematic Review of Preclinical Evidence. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1741-427X, 2021.
- MESSINA, M. Impact of Soy Foods on the Development of Breast Cancer and the Prognosis of Breast Cancer Patients. *Forsch Komplementmed*, 23(2):75-80, 2016.
- MOLLAKHALILI, M.N.; ARAB, M.; ZARE, L. Harmful compounds of soy milk: characterization and reduction strategies. *Journal of Food Science and Technology*, 59:3723-3732, 2022.
- NAGAO, T.; YOSHIMURA, S.; SAITO, Y.; NAKAGOMI, M.; USUMI, K.; ONO, H. Reproductive effects in male and female rats of neonatal exposure to genistein. *Reproductive Toxicology*, 15(4):399-411, 2001.
- NAVARRO, M.C. Mecanismo de acción de las isoflavonas. *Ginecología y Obstetricia Clínica*. 6:159-165, 2005.
- NAWAR, W.W. Lipids. In: FENNEMA, C.R. (Ed.). *Food chemistry*. New York: Marcel Dekker, 139-244, 1985.
- NORMÉN, L.; DUTTA, P.; LIA, A.; ANDERSSON, H. Soy sterol esters and beta-sitostanol ester as inhibitors of cholesterol absorption in human small bowel. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71(4):908-13, 2000.

- PIOTROWSKA, K.; BARANOWSKA-BOSIACKA, I.; MARCHLEWICZ, M.; GUTOWSKA, I.; NOCENÍ, I.; ZAWIŚLAK, M.; CHLUBEK, D.; WISZNIEWSKA, B. Changes in male reproductive system and mineral metabolism induced by soy isoflavones administered to rats from prenatal life until sexual maturity. *Nutrition*, 27(3):372–379, 2011.
- ROBAIRE, B.; HINTON, B.T.; ORGEBIN-CRIST, M.C. The epididymis. In Knobil and Neill's physiology of reproduction. *Academic Press*, 1071-1148, 2006.
- ROBAIRE, B.; VIGER, R.S. Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biology of Reproduction*, 52(2):226-36, 1995.
- ROBERTS, D.; VEERAMACHANENI, D.N.R.; SCHLAFF, W.D.; AWONIYI, C.A. Effects of chronic dietary exposure to genistein, a phytoestrogen, during various stages of development on reproductive hormones and spermatogenesis in rats. *Endocrine*, 13(3):281-286, 2000.
- RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R.A.; SINHA HIKIM, A.P.; CLEGG, E.D. Mammalian spermatogenesis. In: RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R. A.; SINHA HIKIM, A.P.; CLEGG, E.D. (Eds). Histological and histopathological evaluation of the testis. *Bolesta: Cache River Press*, 1-40, 1990.
- SHERRILL, J.D.; SPARKS M.; DENNIS J.; MANSOUR, M.; KEMPPAINEN, B.W.; BARTOL, F.F.; MORRISON, E.E.; AKINGBEMI, B.T. Developmental exposures of male rats to soy isoflavones impact Leydig cell Differentiation1. *Biology of Reproduction*, 83(3):488-501, 2010.
- SHUM, W.W.; DA SILVA, N.; BROWN, D.; BRETON, S. Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk. *Journal of Experimental Biolog.*, 212:1753-61, 2009.
- SILVA, J.V.; PATRÍCIO, A.; MAIA, N.; SILVA, V.; LUERS, G.; MOTA, A.; SILVA, M. F. Análise do Epidídimo Humano, colhido in vivo, pela Microscopia Eletrônica de Transmissão. *Acta Urológica*, 3:23-29, 2011.
- SEDIYAMA, T.; SILVA, F.; BORÉM, A. Soja: do plantio à colheita. Viçosa: Editora UFV, 2015.
- SETCHELL, B.P. Male reproductive organs and semen. In: Cupps, P. T. (Ed): Reproduction in domestic animals. *Academic Press, San Diego*, 6(4):221-250, 1991.
- SETCHELL, K.D.; BROWN, N.M.; ZHAO, X.; LINDLEY, S.L.; HEUBI, J.E.; KING, E.C.; MESSINA, M.J. Soy isoflavone phase II metabolism differs between rodents and humans: implications for the effect on breast cancer risk. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 94(5):1284–1294, 2011.
- SOUZA, A.C.F.; MARCHESI, S.C.; FERRAZ, R.P.; LIMA, G.D.A.; OLIVEIRA, J.A.; NEVES, M.M. Effects of sodium arsenate and arsenite on male reproductive functions in Wistar rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 1-14, 2016.
- SULLIVAN R. Male fertility markers, myth or reality. *Animal Reproduction Science*, 82-83:341-347, 2004.
- TROLL, W.; WIESNER, R. Protease inhibitors: possible anticarcinogenic inedible seeds. *Prostate*, 4:345-9, 1983.

- VOGT, M.B.; FRERE, F.; HAWKS, S.A.; PEREZ, C.E.; COUTERMARSH-OTT, S.; DUGGAL, N.K. Persistence of Zika virus RNA in the epididymis of the murine male reproductive tract. *Virology*, 560:43-53, 2021.
- WEBER, K.S.; SETCHELL, K.D.R.; STOCCO, D.M.; LEPHART, E.D. Dietary soy-phytoestrogens decrease testosterone levels and prostate weight without altering LH, prostate 5 $\alpha$ -reductase or testicular steroidogenic acute regulatory peptide levels in adult male Sprague-Dawley rats. *Journal of Endocrinology*, 170(3):591-599, 2001.
- WOLF, W.D.; COWAN, J.C. Soybean as a protein source. *London: Butterworth*, 150, 1971.
- YAMAMOTO, N.; SHOJI, M.; HOSHIGAMI, H.; WATANABE, K.; WATANABE, K.; TAKATSUZU, T.; ASUDA, S.; IGOSHI, K.; KINOSHITA, H. Antioxidant capacity of soymilk yogurt and exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Bioscience Microbiota Food Health*, 38(3):97-104, 2019.
- YILDIZ, F. Phytoestrogens in Functional Foods. *Taylor & Francis, Ltd*, 3(5):210-211, 2005.
- ZHOU, X.; DU, H.H.; JIANG, M.; ZHOU, C.; DENG, Y.; LONG, X.; ZHAO, X. Antioxidant Effect of *Lactobacillus fermentum* CQPC04-Fermented Soy Milk on D-Galactose-Induced Oxidative Aging Mice. *Frontiers in Nutrition*, 27(8):727467, 2021.
- ZIAEI, S.; HALABY, R. Dietary isoflavones and breast cancer risk. *Medicines (Basel)*,4(2):18, 2017.

## CONCLUSÕES GERAIS

A revisão sistemática colabora para que experimentos já realizados não sejam repetidos. Na revisão sistemática deste trabalho foi observado que o consumo de isoflavonas agliconas e glicosiladas foi prejudicial aos testículos, sendo as doses das glicosiladas de 50, 100, 146, 200, 300, 500 e 600 mg/kg e 190 e 1000 mg/L se mostraram mais nocivas. Além disso, altas doses de isoflavonas podem induzir alterações nas estruturas testiculares, como na microestrutura testicular, agindo diretamente na expressão de genes importantes para a produção de hormônios, levando a infertilidade dos animais experimentais. A administração de isoflavonas isoladas é mais eficiente na avaliação do efeito individual das estruturas testiculares. Entretanto, o composto conjugado (genisteína/daidzeína) foi o mais utilizado nos estudos. As principais patologias testiculares decorrentes da absorção de isoflavonas estão associadas às células de Leydig e são resultado de alterações nas funções moleculares e nos componentes celulares.

Nos trabalhos experimentais, observamos que nos testículos, as bebidas lácteas de soja podem diminuir a esteroidogênese, uma vez que afetou as células de Leydig e o leite de vaca utilizado, pode afetar a espermatogênese, uma vez que diminuiu o epitélio. Com o método utilizado, os compostos testados não apresentaram atividades antioxidantes. A administração das bebidas lácteas de soja e de vaca durante um ciclo da espermatogênese, não altera os níveis séricos de testosterona. Entretanto, o tratamento com as bebidas lácteas de soja durante esse período causa alterações morfológicas nas células de Leydig. Assim, não se exclui o efeito das bebidas lácteas de soja na produção de testosterona após um período maior de tratamento. Ainda, o tratamento com leite de vaca resultou em alterações histológicas testiculares, caracterizados como diminuição da altura e da área do epitélio seminífero, do percentual de vasos sanguíneos e do espaço linfático e aumento do diâmetro e da área do lume tubular. Como o testículo é um órgão complexo, qualquer alteração em sua arquitetura pode gerar graves consequências para a reprodução. Já no epidídimo, o tratamento com as bebidas lácteas de soja com grãos não transgênicos e transgênicos, resultou em diminuição na variação do peso corporal, surgimento de vacuolização e redução dos túbulos normais do segmento inicial e corpo do epidídimo.

Podemos concluir que a revisão sistemática nos ajudou a perceber que mais estudos com os a soja eram necessários para analisar o estado oxidativo dos testículos, para entender a ação das isoflavonas nas células de Leydig e para avaliar a via que leva à alteração dos receptores androgênicos nas células de Sertoli e às alterações histopatológicas no epitélio seminífero. No estudo experimental, observamos que nos testículos, o tratamento com as bebidas lácteas de

soja e de vaca, durante um ciclo espermatogênico, resultam em alterações nas células de Leydig e nos túbulos seminíferos, respectivamente, não excluindo que o consumo desses compostos por um período maior pode resultar em prejuízos para as funções testiculares. No epidídimo, poucas alterações no epidídimo foram observadas, embora, qualquer alteração em sua arquitetura pode ser uma resposta inicial aos efeitos que as bebidas lácteas de soja e leite de vaca podem causar no órgão. Entretanto, mais análises são necessárias, como avaliação do status oxidativo epididimário. Novos estudos com período maior de tratamento, diferentes doses, compostos isolados e a utilização de animais mais jovens também são indicados, esclarecendo o efeito dos compostos testados no testículo e no epidídimo.